Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Enzymhistochemische Untersuchung am kutanen Histiozytom des Hundes

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Thomas Weber
Tierarzt aus Frankfurt a.M.
Berlin 1985

Journal Nr. 1228

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Enzymhistochemische Untersuchung am kutanen Histiozytom des Hundes

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Thomas Weber
Tierarzt aus Frankfurt a. M.
Berlin 1985

Journal Nr. 1228

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher: Prof. Dr. F. Hörchner
Referent: Prof. Dr. R. Rudolph
Korreferent: Prof. Dr. E. Lettow

Tag der Promotion: 3. Mai 1985

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	2
2.1.	Der Gewebsmakrophage im mononukleären Phagozytensystem (MPS)	2
2.2.	Histochemische Nachweismethoden	5
2.2.1.	Methodische Grundlage	5
2.2.2.	Nachweis der unspezifischen Esterasen	10
2.2.2.1.	Vorkommen und Eigenschaften der unspez. Esterasen	10
2.2.2.2.	Histochemische Bedeutung der unspez. Esterasen	13
2.2.2.3.	Lokalisation und Funktion der unspez. Esterasen	19
2.2.3.	Nachweis der Peroxidase	21
2.2.3.1.	Vorkommen und Eigenschaften der Peroxidase	21
2.2.3.2.	Histochemische Bedeutung des Peroxidase-nachweises	22
2.2.3.3.	Lokalisation und Funktion der Peroxidase	29
3.	Eigene Untersuchungen	30
3.1.	Material und Methode	30
3.1.1.	Lichtmikroskopie	30
3.1.1.1.	ALPHA-Naphthylazetat-Esterase	30
3.1.1.2.	Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase	31
3.1.1.3.	Saure Phosphatase	32
3.1.1.4.	Peroxidase	32
3.1.1.5.	Doppelinkubation	33
3.1.1.5.1.	ALPHA-Naphthylazetat-Esterase/ Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase	33
3.1.1.5.2.	ALPHA-Naphthylazetat-Esterase/ Saure Phosphatase	33

		Seite
3.1.2.	Elektronenmikroskopie	33
3.1.2.1.	2-Naphthylthiolazetat-Esterase	33
3.1.2.2.	Peroxidase	34
4.	Ergebnisse	35
4.1.	Epidemiologische Betrachtung des Untersuchungsmaterials	35
4.2.	Lichtmikroskopie	37
4.2.1.	Paraffineingebettetes Gewebe	37
4.2.1.1.	ALPHA-Naphthylazetat-Esterase	37
4.2.1.2.	Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase	37
4.2.2.	Kryostatschnitte	37
4.2.2.1.	ALPHA-Naphthylazetat-Esterase	37
4.2.2.2.	Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase	38
4.2.2.3.	Saure Phosphatase	39
4.2.2.4.	Peroxidase	41
4.2.2.5.	Doppelinkubation	41
4.2.2.5.1.	ALPHA-Naphthylazetat-Esterase/ Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase	41
4.2.2.5.2.	Saure Phosphatase/ ALPHA-Naphthylazetat-Esterase	42
4.3.	Elektronenmikroskopie	44
4.3.1.	2-Naphthylthiolazetat-Esterase	44
4.3.2.	Peroxidase	45
5.	Diskussion	47
6.	Zusammenfassung	59
7.	Summary	60
8.	Literaturverzeichnis	61
9.	Abbildungen	79

1. Einleitung

Das kutane Histiozytom des Hundes ist im Laufe der Zeit unter verschiedenen Bezeichnungen geführt und erst durch Erkenntnisse hinsichtlich seiner Lokalisation, Übertragbarkeit, Dignität und seines Chromosomengehaltes von anderen Neubildungen mesenchymalen Ursprunges abgegrenzt worden. Die Bezeichnung "canine cutaneous histiocytoma" (CCH) erscheint erstmals bei MOULTON (1961) und wird in einer von der World Health Organisation (WHO) herausgegebenen Studie über vergleichende Klassifizierung und Nomenklatur der Tumoren von Mensch und Tier (WEISS 1974) als "canine histiocytoma" übernommen. Einen ausführlichen Überblick der historischen Entwicklung des Begriffes des kutanen Histiozytoms des Hundes hat kürzlich KELM (1982) gegeben und durch eigene morphologische Untersuchungen ergänzt. Bisher bleiben jedoch der Ursprung der Histiozytomzellen und die Pathogenese des kutanen Histiozytoms des Hundes ungeklärt.
Da lediglich GLICK, HOLSCHER und CAMPBELL (1976) über den Nachweis der unspezifischen Esterasen und KELLY (1970) über den Nachweis der Sauren Phosphatase in Histiozytomzellen des Hundes berichten, sollen in der vorliegenden Arbeit weitere Merkmale an diesen Tumorzellen mittels Zytochemie und Histochemie sowie Licht- und Elektronenmikroskopie mitgeteilt werden.

2. Schrifttum

2.1. Der Gewebsmakrophage (Histiozyt) im mononukleären Phagozytensystem (MPS)

Nach VAN FURTH (1981) liegt der Ursprung des Makrophagen in einer Stammzelle des Knochenmarkes. In diesem Kompartiment soll es über mitotische Teilungen zur Bildung von Promonozyten und Monozyten, zum Verlassen der Monozyten des Knochenmarkes in das Blut (Transportkompartiment) und in die Gewebe (z.B. Peritoneum, Lunge, Leber, Haut), den Funktionskompartimenten, mit Entwicklung zum Makrophagen kommen. Die Erneuerung der Makrophagenpopulation in den Geweben erfolgt nach VAN FURTH (1981) durch ständiges Einwandern von Monozyten und zu einem geringen Teil durch Teilung unreifer, ausgewanderter, aber auch aus dem Knochenmark stammender, mononukleärer Phagozyten. Nach einer anderen Ansicht kommt es zwar während einer Entzündung oder unter experimentellen Bedingungen zu einer Zunahme von Makrophagen aus Monozyten (exsudative Makrophagen), davon unabhängig besteht jedoch noch eine ortsständige Gewebsmakrophagenpopulation, z.B. im Peritoneum, die sich durch mitotische Teilung selbst zu erhalten vermag (DAEMS 1980, SHANDS und AXELROD 1977, VOLKMAN 1976).
Untersuchungen mit ^{3}H-markiertem Thymidin zeigen nach DE BAKKER,VAN'T NOORDENDE und DAEMS (1980), daß es sich bei den Gewebsmakrophagen des Peritoneums um eine proliferative Zellpopulation mit Befähigung zur DNA-Synthese handelt. Versuche mit einer Eisendextran-Lösung zur Markierung von Lysosomen und Zytoplasma sprechen ebenfalls dafür, daß Gewebsmakrophagen des Peritoneums und exsudative Makrophagen verschiedenen Ursprunges sind (DE BAKKER,DE WIT und DAEMS 1981).

Es hat sich gezeigt, daß sich Monozyten, exsudative Makrophagen und Gewebsmakrophagen hinsichtlich ihrer Peroxidaseaktivität unterscheiden (DAEMS und BREDEROO 1973, DAEMS und KOERTEN 1978).
Bei Gewebsmakrophagen sieht man Peroxidase-Aktivität im rauhen endoplasmatischen Retikulum (RER) und im perinukleären Spaltraum (DAEMS und BREDEROO 1973, OGAWA,KOERTEN und DAEMS 1978, SORANZO,KOERTEN und DAEMS 1978), hingegen bei Monozyten und von diesen abstammenden Makrophagen in den Lysosomen. Lysosomen von Gewebsmakrophagen sind gänzlich frei von endogener Peroxidase-Aktivität (DAEMS,ROOS,VAN BERKEL und VAN DER RHEE 1979).
Unter bestimmten Umständen zeigen Monozyten in vitro ebenfalls Peroxidase-Aktivität im rauhen endoplasmatischen Retikulum (BODEL,NICHOLS und BAINTON 1977, DEIMANN und FAHIMI 1977, BEELEN,FLUITSMA und HOEFSMIT 1980).
BEELEN (1981) teilt Makrophagen entsprechend der Lokalisation der Peroxidase-Aktivität sogar in vier Gruppen ein. Danach haben exsudative, von Monozyten abstammende Makrophagen Peroxidase-Aktivität in den Lysosomen, Gewebsmakrophagen im rauhen endoplasmatischen Retikulum und im perinukleären Spaltraum. Zwischen diesen beiden Makrophagen liegt eine "transiente" Zelle, der exsudative Gewebsmakrophage, mit Peroxidase-Aktivität in den Lysosomen, dem rauhen endoplasmatischen Retikulum und dem perinukleären Spaltraum. Der vierte Makrophage zeigt schließlich keinerlei Peroxidase-Aktivität. Er kann sowohl aus dem Gewebsmakrophagen, als auch aus dem exsudativen Makrophagen hervorgegangen sein. Alle Aktivitätsmuster werden als Entwicklungsstufe einer Zelle angesehen. Promonozyten und Monozyten zeigen nach BEELEN (1981) ebenfalls Peroxidase-Aktivität.
DE BAKKER,DE WIT und DAEMS (1981) sind der Auffassung, daß Gewebsmakrophagen mit einer permanenten Peroxidase-Aktivität im rauhen endoplasmatischen Retikulum nicht vom Monozyten

abstammen können, da dieser eine entsprechende Aktivität nur vorübergehend zeige. Nach OGAWA, KOERTEN und DAEMS (1978) tritt diese Peroxidase-Aktivität bei Monozyten in vitro zwei Stunden nach der Haftung an den Kulturgefäßen ein, nimmt bereits nach acht Stunden ab und ist nach drei bis vier Tagen nicht mehr nachweisbar. Entgegen BODEL,NICHOLS und BAINTON (1977) kommen OGAWA,KOERTEN und DAEMS (1978) zu dem Schluß, daß die Peroxidase-Aktivität keine Folge der Anhaftung der Zellen auf eine Unterlage ist, da einerseits frei im Peritoneum flottierende Gewebsmakrophagen ebenfalls über eine Peroxidase-Aktivität verfügen (MIMS 1963, ORENSTEIN und SHELTON 1976), und andererseits Monozyten, die bei in vivo Versuchen an Melinex gebunden werden und sich zu Epitheloid- und Riesenzellen differenzieren, keine Peroxidase-Aktivität im rauhen endoplasmatischen Retikulum haben (VAN DER RHEE, DE WINTER und DAEMS 1977).

OGAWA,KOERTEN und DAEMS (1978) bringen aufgrund der Gleichartigkeit der Peroxidase-Aktivität Gewebsmakrophagen in originären Zusammenhang mit Retikulumzellen, zumal Übergangsformen zwischen diesen Zellen und den Makrophagen regelmäßig beobachtet werden können.

Ähnliche Untersuchungen mit gleichen Ergebnissen wie von OGAWA,KOERTEN und DAEMS (1978) an der Maus wurden ebenfalls am Meerschweinchen (DAEMS und BREDEROO 1973, SORANZO,KOERTEN und DAEMS 1978), der Ratte (FAHIMI 1970, HOEFSMIT 1975, KOJIMA 1977, VAN DER RHEE,DE WINTER und DAEMS 1977) und am Menschen (NICHOLS und BAINTON 1975) durchgeführt.

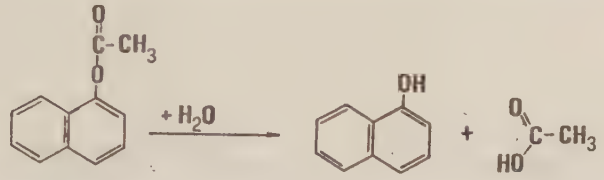
2.2. Histochemische Nachweismethoden

2.2.1. Methodische Grundlage

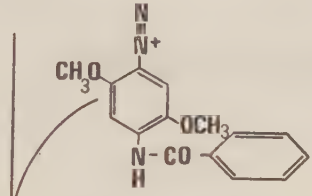
Für die Durchführung der Azofarbstoffmethode zum Nachweis hydrolytischer Enzyme stehen die succedane und die simultane Methode zur Auswahl (GÖSSNER 1958). Letztere bildet die methodische Grundlage dieser Arbeit.
Die Probleme, die aus dem simultanen Verfahren resultieren, liegen in der Interferenz von Substrat (Ester), primärem Reaktionsprodukt (Naphthol) und Koppler (Diazoniumsalz). Zur genauen Enzymlokalisation ist es erforderlich, das Naphthol als primäres Reaktionsprodukt in Form eines unlöslichen Farbkomplexes zu präzipitieren. Hierfür ist eine hohe Kopplungsenergie der Diazoniumverbindung erforderlich, die zum einen pH-abhängig ist, zum anderen durch geeignete Substituenten beeinflußbar ist. Eine Erhöhung der Temperatur und der Konzentration des Diazoniumsalzes führt ebenfalls zu einer Beschleunigung der Kopplungsreaktion. Zu hohe Diazoniumkonzentrationen hemmen die Enzymaktivität. Durch Rühren des Inkubationsmediums wird bei geringem Salzgehalt ein Konzentrationsabfall der Diazoniumverbindung am Reaktionsort vermieden. Da die Reaktionsgeschwindigkeit der Esterasen ohnehin sehr hoch ist, läßt sich, um Artefakte durch Diffusion des entstandenen Reaktionsproduktes und durch die Zersetzungsprodukte des Diazoniumsalzes bei hohen Temperaturen zu verhindern, der Nachweis bei einer Temperatur nahe $0^{\circ}C$ durchführen. Die Inkubationszeit wird dann entsprechend verlängert. Die Farbe der Reaktionsprodukte ist abhängig vom gewählten Substrat und vom eingesetzten Diazoniumsalz. Aufgrund der Löslichkeit der entstehenden Farbkomplexe in Äthanol, Azeton, Xylol und den Einbettungsmedien sowie auch der geringen Dichte eignen sich

die meisten Substrate nicht für die Elektronenmikroskopie (HANKER,SEAMAN,WEISS,UENO,BERGMAN und SELIGMAN 1964, SELIGMAN,UENO,WASSERKRUG und HANKER 1966, PAYNE,KIM, PANGALIS,ROTHMAN und RAPPAPORT 1980). Bei einem von HANKER,SEAMAN,WEISS,UENO,BERGMAN und SELIGMAN (1964) und SELIGMAN,UENO,WASSERKRUG und HANKER (1966) entwickelten und beschriebenen und von PAYNE,KIM,PANGALIS,ROTHMAN und RAPPAPORT (1980) eingesetzten Verfahren wird als Substrat für die unspezifische Esterase ein Thiolazetat verwendet. Der mit dem diazotierten Salz entstehende Farbkomplex ist stabil und osmiophil. Der Sitz der Esterasen wird somit durch den Niederschlag von Osmiumsalz markiert und wird nicht durch Äthanol, Azeton, Xylol oder Einbettungsmedien gelöst.

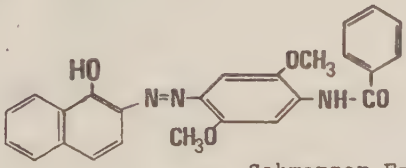
ALPHA-Naphthylazetat-Esterasenachweis: Simultanmethode



ALPHA-Naphthylazetat ALPHA-Naphthol Essigsäure



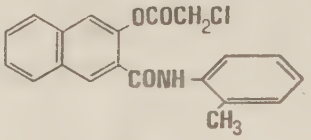
Echtblausalz RR
fast blue salt RR



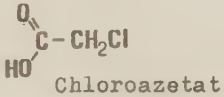
Schwarzer Farbkomplex
black dye complex

In Anlehnung an MOLONEY,MCPHERSON und FLIEGELMAN 1960

Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterasenachweis: Simultanmethode



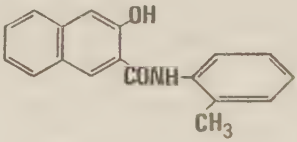
+ H_2O



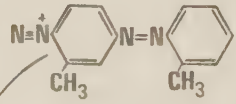
Chloroazetat

+

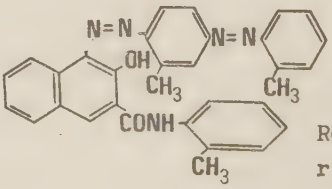
Naphthol-AS-D-Chloroazetat



Naphthol-AS-D



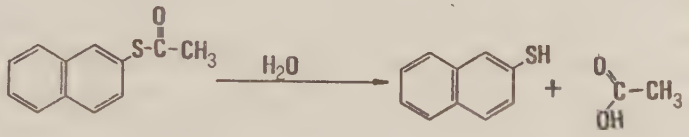
fast garnet GBC



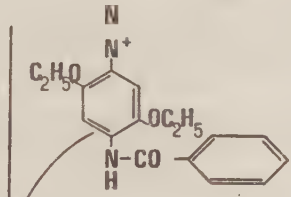
Roter Farbkomplex
red dye complex

Nach MOLONEY,MCPHERSON und FLIEGELMAN 1960

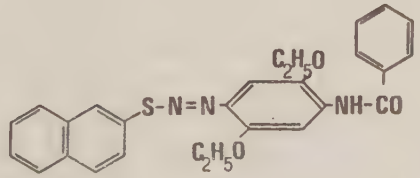
Esterasenachweis mit 2-Naphthylthiolazetat: Simultanmethode



2-Naphthylthiolazetat · 2-Naphthylthiol Essigs.



Echtblausalz BB
fast blue BB salt



+ OsO_4

Schwarzer
Farbkomplex
black dye complex

In Anlehnung an SELIGMAN,UENO,WASSERKRUG und HANKER 1966

2.2.2. Nachweis der unspezifischen Esterasen

Die Benennung der Esterasen erfolgt nach den zu ihrer Identifizierung notwendigen Substraten (CATOVSKY und COSTELLO 1979). Verbreitete Substrate zum Nachweis der unspezifischen Esterasen in der Lichtmikroskopie sind das ALPHA-Naphthylazetat und das Naphthol-AS-D-Chloroazetat. Ihre Reaktionsprodukte sind chromogen und in vielen organischen Lösungsmitteln unlöslich (KNOWLES II,HOFFMAN, FERRARINI und KUNKEL 1978). Da sich diese Substrate zur Darstellung der unspezifischen Esterasen in der Elektronenmikroskopie nicht eignen, wird hier 2-Naphthylthiolazetat als Substrat verwendet (PAYNE,KIM,PANGALIS,ROTHMAN und RAPPAPORT 1980).

2.2.2.1. Vorkommen und Eigenschaften der unspezifischen Esterasen

Die Esterasen zeigen hinsichtlich ihrer Substrate, ihrer Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Inhibitoren und den Zellen, in denen sie vorkommen, Spezifität (CATOVSKY und COSTELLO 1979). LI,LAM und YAM (1973) finden mit Hilfe der Gel-Polyakrylelektrophorese und unter Einsatz verschiedener Substrate in Blutzellen des Menschen neun verschiedene Isoenzyme der ALPHA-Naphthylazetat Esterase. YOUNG und BITTAR (1973) isolieren aus Homogenaten von gesunden Organen, Tumorgeweben und Erythrozyten 18 Isoenzyme. RADZUN,PARWARESCH,KULENKAMPFF,STAUDINGER und STEIN (1980) zeigen, daß zwischen den verschiedenen Isoenzymen, dem pH-Wert des Mediums und den untersuchten Zellen eine charakteristische Beziehung besteht. NACHLAS und SELIGMAN (1949) haben mit ALPHA-Naphthylazetat bei polymorphkernigen Leukozyten eine positive Reaktion feststellen können. WACHSTEIN und WOLF (1958) benutzen Naphthol-AS-Azetat zum Nachweis der unspezifischen Esterase

bei allen "geformten Elementen des peripheren Blutes und des Knochenmarkes". BRAUNSTEIN (1958) geht davon aus, daß sich mit ALPHA-Naphthylazetat-Esterase-Aktivität nur in Monozyten, nicht aber in den neutrophilen Granulozyten nachweisen läßt. Ferner wird dieses Substrat zum Nachweis der unspezifischen Esterase in Histiozyten, Megakariozyten, Lymphozyten und Plasmazellen angewendet (YAM,LI und CROSBY 1971, PINKUS,HARGREAVES,MCLEOD,NADLER, ROSENTHAL und SAID 1979, BRAUNSTEIN 1958), dabei läßt sich die ALPHA-Naphthylazetat-Esterase-Aktivität im Monozyten mit Natriumfluorid hemmen.
OSBALDISTON,SULLIVAN und FOX (1978) weisen darauf hin, daß die Aktivität der ALPHA-Naphthylazetat-Esterase in den verschiedenen Zellen nicht nur von dem pH-Wert und der Inkubationsdauer, sondern auch von den untersuchten Spezies abhängt. So stellen die vorgenannten Autoren durch geeignete Wahl der zwei Parameter die ALPHA-Naphthylazetat-Esterase in den neutrophilen Granulozyten von Hund, Kaninchen, Meerschweinchen, Hamster, Schaf, Ziege und Ratte, unter keinen Umständen jedoch von Mensch, Katze und Schwein dar.
Eine Zunahme der Esterase-Aktivität mit der Reifung zeigen FERRARINI,MACCARIO,MARCONI,VITIELLO,UGAZIO,BURGIO und SICCARDI (1980) durch Kultivierung unreifer Monozyten. HORWITZ,ALLISON,WARD und KIGHT (1977) stellen ebenfalls fest, daß nach einer Inkubation von 24-48 Stunden der Anteil ALPHA-Naphthylazetatesterase-positiver Monozyten zunimmt. MEURET (1981) sieht bei Monozyten eine altersabhängige Änderung der Reaktionsintensität: Unreife Monozyten, charakterisiert durch einen rund-ovalen Kern, zeigen eine geringe Aktivität der ALPHA-Naphthylazetat-Esterase, reife Monozyten mit gefaltetem Kern zeigen hingegen eine starke Aktivität. Monozyten (NARDIELLO, PIZZELLA,RUSSO und GALANTI 1982), Makrophagen und Histiozyten weisen eine diffuse zytoplasmatische Verteilung der ALPHA-Naphthylazetat-Esterase-Reaktionsprodukte auf

und unterscheiden sich damit von den T-Lymphozyten (YAM, LI und CROSBY 1971).
PAYNE,KIM,PANGALIS,ROTHMAN und RAPPAPORT (1980) zeigen, daß sich 2-Naphthylthiolazetat, zur elektronenmikroskopischen Darstellung der unspezifischen Esterase eingesetzt, lichtmikroskopisch ähnlich verhält wie ALPHA-Naphthylazetat und Naphthol-AS-D-Azetat und ziehen daraus inbezug auf Verteilung der Reaktionsprodukte und Reaktionsmuster den Analogieschluß für Licht- und Elektronenmikroskopie.
Bereits 1953 hat GOMORI ein Verfahren beschrieben, Gewebsmastzellen sowie Zellen der myeloischen Reihe mit Hilfe von Naphthol-AS-Chloroazetat bei Mensch, Hund, Ratte, Maus und Kaninchen nachzuweisen, während sich Monozyten, Lymphozyten und Stammzellen und z.T. eosinophile Granulozyten nicht anfärben ließen. BURSTONE (1957) arbeitet mit einigen Naphthol-AS-Verbindungen, bis MOLONEY, MCPHERSON und FLIEGELMAN (1960) das Naphthol-AS-D-Chloroazetat synthetisieren, mit dem reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können.
Ähnlich wie bei der ALPHA-Naphthylazetat-Esterase zeigen OSBALDISTON,SULLIVAN und FOX (1978) auch bei der Chloroazetat-Esterase eine deutliche Abhängigkeit von pH-Wert und Inkubationsdauer. So gelingt es ihnen bei einem pH-Wert zwischen 5,5-6,5, in den Monozyten aller untersuchten Spezies und in den Lymphozyten mit Ausnahme der Katze Esterase-Aktivität nachzuweisen. Zur Darstellung von Chloroazetat-Esterase-Aktivität in neutrophilen Granulozyten sind in der Regel ein höherer pH-Wert erforderlich (6,0-7,5, Ausnahme Schaf: 5,5) und meist eine kürzere Inkubationszeit.

2.2.2.2. Histochemische Bedeutung der unspezifischen Esterasen

ALPHA-Naphthylazetat-Esterase (ANAE) wird als spezifischer Marker für T-Lymphozyten bezeichnet (KULENKAMPFF,JANOSSY und GREAVES 1977, HOVMARK 1977, PANGALIS,WALDMAN und RAPPAPORT 1978). Die T-Lymphozyten reagieren allerdings nicht einheitlich. So sind T_G-Zellen (IgG-Rezeptor, Suppressorfunktion) nur zu etwa 10% Esterase-positiv, während T_M-Zellen (IgM-Rezeptor, Helferzellfunktion) eine sehr starke Reaktion zeigen (PINKUS,HARGREAVES,MCLEOD,NADLER, ROSENTHAL und SAID 1979). BURGIO,MACCARIO,RAFFAELLA und UGAZIO (1981) zeigen, daß die ANAE-pos. Reaktion an membranständige Rezeptoren gebunden scheint. T_M-Zellen haben ein punktförmiges (dot-like) Reaktionsbild, T_G-Zellen eine diffuse paranukleäre Akkumulation, die mit dem Golgifeld positiv korreliert (ZICCA,LEPRINI,CADONI,FRANZI, FERRARINI und GROSSI 1981, BURGIO,MACCARIO,RAFFAELLA und UGAZIO 1981). Die ANAE läßt sich in aggregierten Lysosomen von T-Lymphozyten paranukleär in der unmittelbaren Umgebung lipidhaltiger Vakuolen nachweisen (RADZUN,PARWARESCH, KULENKAMPFF,STAUDINGER und STEIN 1980).
Neoplastische T-Lymphozyten sind nur dann ANAE-positiv, wenn es sich um eine benigne, nicht jedoch um eine maligne Neoplasie handelt (CHU,MORGAN und MACDONALD 1981).
Die Lokalisation der esterasepositiven Zellen in den Lymphfollikeln spiegelt den Zusammenhang von Esterase-Aktivität und Zellreifung wieder. So sind medulläre Thymozyten positiv, kortikale negativ. Sie unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer Größe (klein,mittel,groß), wobei die mittleren Thymozyten (ruhend,reif) durchweg ANAE-positiv sind (KNOWLES II,HOFFMAN,FERRARINI und KUNKEI 1978). Allgemein läßt sich sagen, daß mit der Reifung eine Änderung der kurz vorher einsetzenden Esterase-Aktivität von diffus nach granulär einsetzt, wie sie

bei reifen T-Lymphozyten gesehen wird (MYSLIWSKA,WITKOWSKI und MYSLIWSKA 1980).
T-Lymphozyten des Blutes haben deutlich ein bis drei punktförmige Niederschläge mit einem Durchmesser von 0,5-2,0 Mikrometer paranukleär im Zytoplasma (CHU,MORGAN und MACDONALD 1981, TOLKSDORF und STEIN 1979).
In etwa 7% der normalen B-Lymphozyten läßt sich ANAE ebenfalls nachweisen. Etwa 20-33% der B-Lymphozyten zeigen hingegen eine positive Reaktion, wenn sie,durch B-Zell-Mitogene (z.B. E.-coli Lipopolysaccharide) aktiviert, B-Zellblasten bilden (KNOWLES II,HALPER,MACHIN und SHERMAN 1979). PINKUS,HARGREAVES,MCLEOD,NADLER,ROSENTHAL und SAID (1979) kommen zu ähnlichen Ergebnissen. Neoplastische Zellen einiger B-Zell-Lymphome des Menschen zeigen eine sehr starke ANAE-Reaktivität (PINKUS,HARGREAVES,MCLEOD, NADLER,ROSENTHAL und SAID 1979), so daß ANAE nicht spezifisch für T-Lymphozyten zu sein scheint, sondern ein quantitativer und qualitativer Unterschied zwischen beiden Lymphozytenpopulationen besteht (MUELLER,BRUN DEL RE, BUERKI,KELLER,HESS und COTTIER 1975, PINKUS,HARGREAVES, MCLEOD,NADLER,ROSENTHAL und SAID 1979).
Bei der Untersuchung von bovinen und humanen T- und B-Lymphozyten auf Esterase-Aktivität mit Naphthol-AS-D-Chloroazetat erzielen YANG,JANTZEN und WILLIAMS (1979) negative Ergebnisse.
YAM,LI und CROSBY (1971) und LI,LAM und YAM (1973) benutzen Naphthol-AS-D-Chloroazetat zum Nachweis der Esterase-Aktivität bei neutrophilen Granulozyten. MOLONEY,MCPHERSON und FLIEGELMAN (1960), LEDER (1964), sowie CHILOSI, MENESTRINA,PIZZOLO, MACONI,IANNUCCI,BONETTI und FIORE-DONATI (1981) beschreiben neutrophile Granulozyten und Mastzellen als Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase-positiv.
RUDOLPH (1972) sieht bei Tumormastzellen des Hundes mit fortschreitender Reifung der Zellen eine Aktivitätszunahme der Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase.

MOLONEY,MCPHERSON und FLIEGELMAN (1960) benutzen zum Nachweis von Histiozyten sowohl des Knochenmarkes als auch der Gewebe Naphthol-AS-D-Chloroazetat. Sie sehen, daß Monozyten und deren Vorstufen keine oder nur eine geringe Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase-Aktivität besitzen. Nach MEURET (1981) zeigen junge Monozyten eine hohe, und reife Monozyten nur eine sehr geringe Aktivität mit dem Naphthol-AS-D-Chloroazetat. Bei einer durch akute oder chronische Entzündungen, Infektionskrankheiten, immunologischen und malignen Erkrankungen angeregten Monozytopoese kommt es zu einem verstärkten Austritt von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark ins Blut, damit geht eine Zunahme der Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase-Aktivität und eine Aktivitätsabnahme der ANAE in den Blutmonozyten einher (MEURET,SCHMITT,TSELENI und WIDMER 1978).

Von GLICK,HOLSCHER und CAMPBELL (1976) stammt die bislang einzige Arbeit über den Nachweis der unspezifischen Esterase mit ALPHA-Naphthylazetat und Naphthol-AS-D-Chloroazetat beim kutanen Histiozytom des Hundes (CCH). Sie beschreiben die CCH-Zellen als solche mit einer diffusen zytoplasmatischen ANAE-Reaktion. Eine Chloroazetat-Reaktion können die Autoren nur bei Mastzellen und neutrophilen Granulozyten finden.

Eine Zusammenfassung der gefundenen Ergebnisse ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

Autorenindex zu Tabelle 1

BRAUNSTEIN 1958

CHILOSI,MENESTRINA,PIZZOLO,MACONI,IANNUCCI,BONETTI und FIORE-DONATI 1981

CHU,MORGAN und MACDONALD 1981

DESAGA,PARWARESCH und MÜLLER-HERMELINK 1971

GLICK,HOLSCHER und CAMPBELL 1976

HELMIN und SAAR 1984

HORWITZ,ALLISON,WARD und KIGHT 1977

HOVMARK 1977

KNOWLES II,HOFFMAN,FERRARINI und KUNKEI 1978

KULENKAMPFF,JANOSSY und GREAVES 1977

LEDER 1964

MEURET 1981

MOLONEY,MCPHERSON und FLIEGELMAN 1960

MUELLER,BRUN DEL RE,BUERKI,KELLER,HESS und COTTIER 1975

OSBALDISTON,SULLIVAN und FOX 1978

PANGALIS,WALDMAN und RAPPAPORT 1978

PARWARESCH,MÜLLER-HERMELINK,DESAGA,ZAKARI und LENNERT 1971

PINKUS,HARGREAVES,MCLEOD,NADLER,ROSENTHAL und SAID 1979

RUDOLPH 1972

RUDOLPH und SCHNABL 1979

YAM,LI und CROSBY 1971

YANG,JANTZEN und WILLIAMS 1979

ZICCA,LEPRINI,CADONI,FRANZI,FERRARINI und GROSSI 1981

Tabelle 1

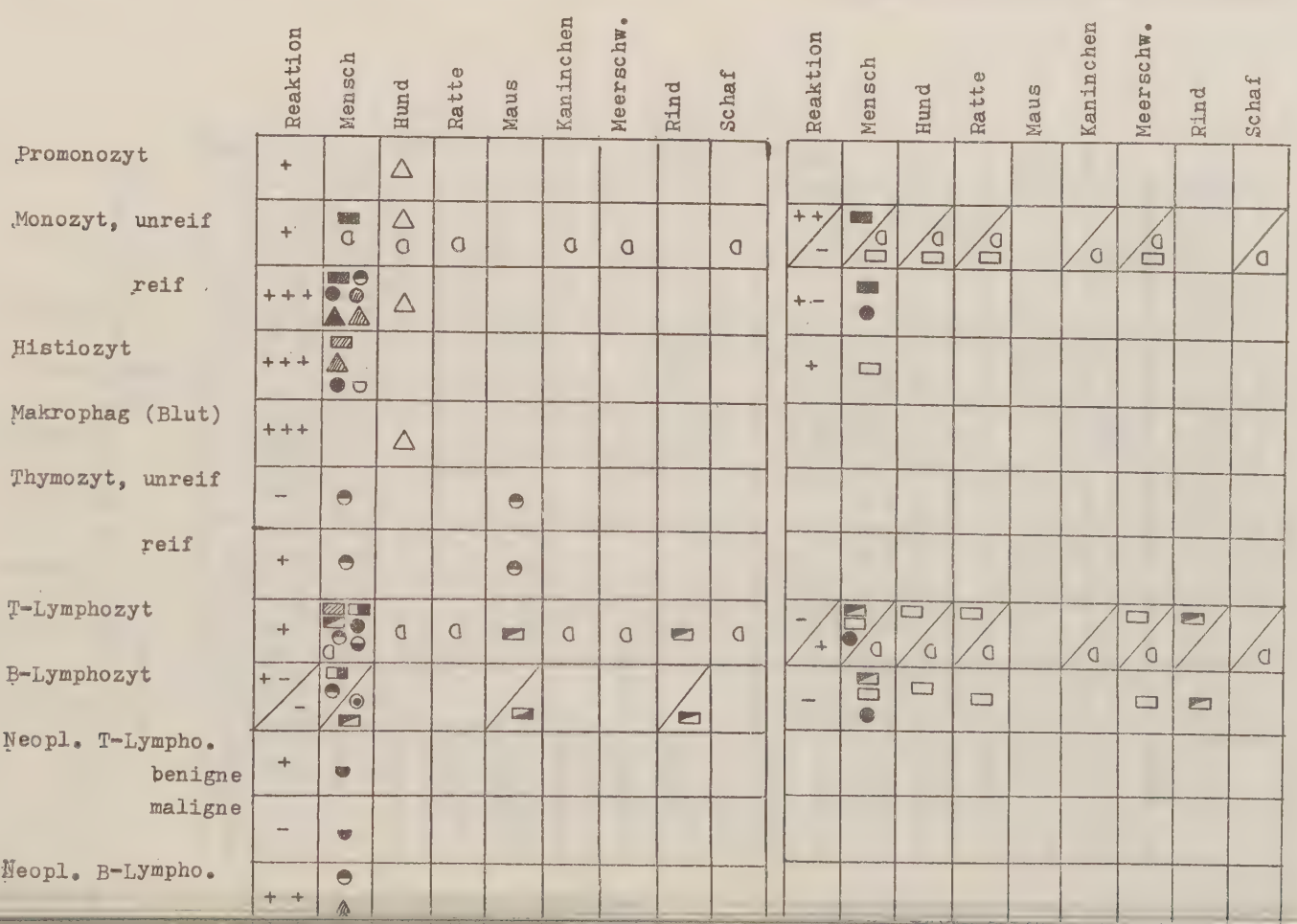
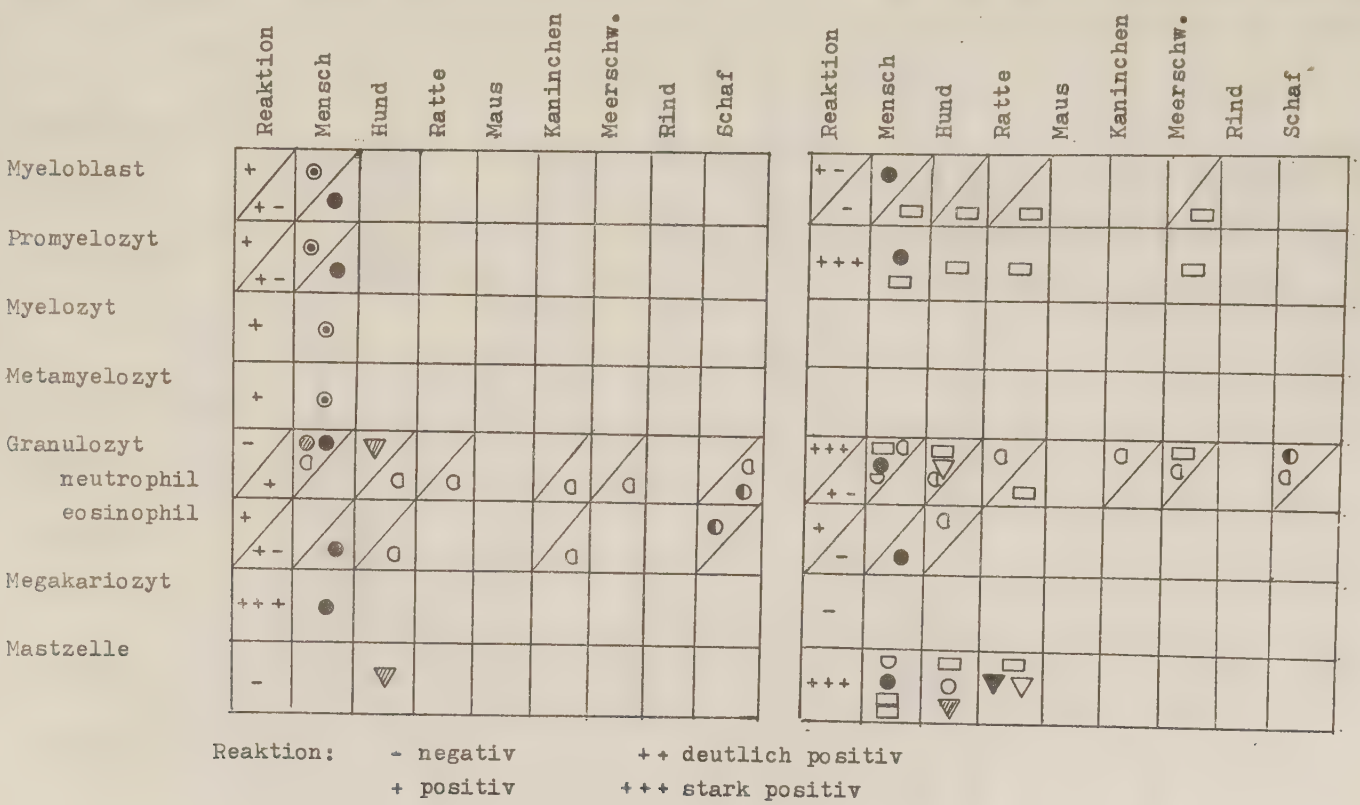

ALPHA-Naphthylazetat-Esterase
Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase
Reaktion
Mensch
Hund
Ratte
Maus
Kaninchen
Meerschw.
Rind
Schaf
Promonozyt
Monozyt, unreif
reif
Histiozyt
Makrophag (Blut)
Thymozyt, unreif
reif
T-Lymphozyt
B-Lymphozyt
Neopl. T-Lympho.
benigne
maligne
Neopl. B-Lympho.

Tabelle 1



Reaktion: - negativ ++ deutlich positiv
+ positiv +++ stark positiv

2.2.2.3. Lokalisation und Funktion der unspezifischen Esterasen

ZICCA,LEPRINI,CADONI,FRANZI,FERRARINI und GROSSI (1981) weisen die unspezifische Esterase mit Hilfe des ALPHA-Naphthylazetates als Substrat und hexazotiertem Pararosanilin als Koppler elektronenmikroskopisch nach. Die präzipitierten Farbkomplexe sind ohne Osmierung von ausreichender Elektronendichte. Es gelingt damit, die Lokalisation der Esteraseaktivität im T-Lymphozyten darzustellen. Als Reaktionsprodukte finden sich ein bis drei Granula pro Zelle. Diese Granula sind homogen, scharf umschrieben und scheinen von einer Einheitsmembran umgeben; andere Granula weisen ein helles Zentrum mit einem diffusen, esterasepositiven Hof auf. Die Autoren kommen zu dem Schluß, daß es sich bei diesen Granula um primäre Lysosomen handelt, die ihre Esterase teilweise an die Peripherie abgeben. STERRY,STEIGLEDER und PULLMANN (1980) kommen bei ihren Untersuchungen mit ANAE an T-Lymphozyten ebenfalls zu der Auffassung, daß der Reaktionsort der unspezifischen Esterase in den Lysosomen liegt. PAYNE,KIM,PANGALIS,ROTHMAN und RAPPAPORT (1980) kommen bei der Suche nach dem Ort der Enzymaktivität mit Hilfe des 2-Naphthylthiolazetates in Monozyten und Histiozyten zu einem anderen Ergebnis als ZICCA,LEPRINI,CADONI,FRANZI, FERRARINI und GROSSI (1981), da sie die esterasepositiven Granula in keinerlei Zusammenhang mit irgendwelchen Zellorganellen sehen, keine Anzeichen einer Einheitsmembran finden und die Anzahl positiv reagierender Granula jene der Lysosomen bei weitem übersteigt. DEIMLING und MADREITER (1972) sehen bei ihren Untersuchungen mit ANAE eine positive Korrelation zwischen Reaktionsprodukt und dem endoplasmatischen Retikulum. BÖCKING (1974) weist ebenfalls mit ANAE an Leberzellen Esterase-Aktivität in den Zysternen des glatten endoplasmatischen Retikulums,

zum Teil zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran, selten in der Matrix von Mitochondrien, in der Peripherie von gespeicherten Fetttröpfchen und in der perinukleären Zysterne fraktionierter Leberzellkerne nach.
CATOVSKY und COSTELLO (1979), die die unspezifische Esterase an normalen und leukämischen Lymphozyten des Menschen mit ALPHA-Naphthylazetat nachweisen, können der Esterase in Leukozyten keine Funktion zuweisen, ebenso wenig gelingt dies CHILOSI,PIZZOLO,MENESTRINA,IANNUCCI,BONETTI und FIORE-DONATI (1981) oder PEARSE (1958).
FERLUGA,ASHERSON und BECKER (1972) vermuten eine Verbindung zwischen der Esteraseaktivität und dem "cytotoxic killing" der T-Lymphozyten.

2.2.3. Nachweis der Peroxidase

2.2.3.1. Vorkommen und Eigenschaften der Peroxidase

Die Peroxidase gehört zu den Hämoproteinen. Nach LOJDA, GOSSRAU und SCHIEBLER (1976) kommt die Peroxidase vor allem in der Mamma, ferner in der Schilddrüse,in der großen Speicheldrüse sowie in Mastzellen vor. Leukozyten verfügen über die Myeloperoxidase. Dieses Enzym kommt vor allem in Zellen der myeloischen Reihe vor, wie eosinophile und neutrophile Granulozyten und deren Vorläufer (CHILOSI,PIZZOLO,MENESTRINA,IANNUCCI,BONETTI und FIORE-DONATI 1981, YAM,LI und CROSBY 1971).Die Myeloperoxidase kann mit allen Peroxidasereaktionen nachgewiesen werden und hat somit Bedeutung für den Nachweis und zur Differentialdiagnose von Hämoblastosen erlangt (LOJDA, GOSSRAU und SCHIEBLER 1976, CHILOSI,MENESTRINA,PIZZOLO, MACONI,IANNUCCI,BONETTI und FIORE-DONATI 1981). Die Myeloperoxidase in den neutrophilen Granulozyten läßt sich durch Zugabe von 50mM Kaliumzyanid (KCN) selektiv hemmen, während eosinophile Granulozyten nach wie vor eine Peroxidasereaktion zeigen (YAM,LI und CROSBY 1971, LOJDA,GOSSRAU und SCHIEBLER 1976).
Die Katalase, die in tierischen Zellen (Hepatozyten, proximale Nierentubuluszellen) vorkommt, besitzt ebenfalls Peroxidaseaktivität und eignet sich zur Darstellung von Peroxisomen (LOJDA,GOSSRAU und SCHIEBLER 1976).
Neben den genannten Enzymen zeigen aber auch Proteine mit hämoprostetischer Gruppe Peroxidasewirkung. Zu diesen Proteinen zählt das Hämo- bzw. das Myoglobin. Diese Proteine werden auch als Pseudoperoxidasen bezeichnet (LOJDA,GOSSRAU und SCHIEBLER 1976).
Durch Änderung von pH-Wert, H_2O_2-Konzentration und Gewebebehandlung ist es möglich, Peroxidasenachweisverfahren

so zu modifizieren, daß sich die einzelnen Peroxidasen leichter gegeneinander abgrenzen lassen. So läßt sich z.B. mit der Methode nach GRAHAM und KARNOVSKY (1966) bei einem pH-Wert von 6,0 und einer Einstellung der H_2O_2-Konzentration bei 0,003%, die Pseudoperoxidase-Aktivität der Cytochrome gut darstellen, Katalasen bei einem pH-Wert oberhalb 9,0 und vergleichsweise höherer Peroxidkonzentration (0,035%-0,07%).
Optimale zytochemische Bedingungen für die selektive Darstellung der Peroxidase-Aktivität sind eine kurze oder keine Fixierung des Gewebes und ein neutraler pH-Wert des Inkubationsmediums (VAN DER RHEE,VAN DER BURGH-DE WINTER und DAEMS 1979).
Erhitzung führt zu einer Unterdrückung der echten Peroxidasen (LOJDA,GOSSRAU und SCHIEBLER 1976, FAHIMI 1970). Fixierung in Glutaraldehyd zieht eine Schwächung der Peroxidase-Aktivität nach sich (FAHIMI 1970) bzw. unterdrückt sie in Megakariozyten und Thrombozyten (CATOVSKY, CROCKARD,MATUTES und O'BRIAN 1981) vollständig.
Myeloperoxidase ist auch nach längerer Formaldehydfixierung nachweisbar (LOJDA,GOSSRAU und SCHIEBLER 1976). Kaliumzyanid (0,065%) hemmt Peroxidasen und Pseudoperoxidasen, Katalase wird hingegen nur wenig und Myeloperoxidase fast nicht beeinflußt (FAHIMI 1970, LOJDA,GOSSRAU und SCHIEBLER 1976). Aminotriazol unterdrückt Katalase und z.T. einige Peroxidasen (LOJDA,GOSSRAU und SCHIEBLER 1976). Vollständige Inaktivierung der Peroxidase-Aktivität folgt bei hoher H_2O_2-Konzentration (FAHIMI 1970).

2.2.3.2. Histochemische Bedeutung des Peroxidasenachweises

Die Peroxidase-Aktivität läßt sich zur Zelldifferenzierung heranziehen. Reaktionsprodukte werden gesehen in Monozyten, exsudativen Makrophagen, Gewebsmakrophagen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Lymphatische Zellen sind

hingegen frei von Peroxidase-Aktivität (DAEMS und BREDEROO 1973).

Promyelozyten und Myelozyten eosinophiler und neutrophiler Granulozyten zeigen Aktivität in Zisternen des endoplasmatischen Retikulums, des perinukleären Spaltraumes, und in den Golgikomplexen (MILLER und HERZOG 1969, BAINTON und FARQUHAR 1970).

Nach Untersuchungen von RUDOLPH und SCHNABL (1979,1981) an Blutleukozyten des Schafes zeigen eosinophile und neutrophile Granulozyten granuläre Reaktionsprodukte. Bei den Eosinophilen werden sie in der Matrix der spezifischen eosinophilen Granula gesehen, den kristalloiden Innenkörper aussparend, während bei den Neutrophilen nur in etwa 25-30% aller Granula Reaktionsprodukte nachzuweisen sind.

Während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen kommt es zu einem Verlust der Primär- und Sekundärgranula. Hingegen nimmt die Anzahl der Mikroperoxisomen bei der Differenzierung von Makrophagen zu Epitheloid- oder multinukleären Riesenzellen zu, gleichzeitig werden aus den Primär- bzw. Sekundärgranula sogenannte Makrophagen- bzw. Epitheloidzellgranula ohne jegliche Peroxidase-Aktivität (VAN DER RHEE,VAN DER BURGH-DE WINTER und DAEMS 1979). Primär-, Sekundärgranula und Mikroperoxisomen zeigen Peroxidase-Aktivität mit unterschiedlichen zytochemischen Charakteristika (DAEMS und BREDEROO 1973, VAN DER RHEE, DE WINTER und DAEMS 1977), die sich durch unterschiedliche pH-Werte und H_2O_2-Konzentrationen des Inkubationsmediums darstellen lassen (VAN DER RHEE, VAN DER BURGH-DE WINTER und DAEMS 1979). Die Peroxidase-Aktivität in den Primärgranula, die bereits in den Promonozyten gebildet werden, ist während der Zelldifferenzierung in qualitativer und quantitativer Hinsicht einer Alteration unterworfen (VAN DER RHEE, DE WINTER und DAEMS 1977, VAN DER RHEE,VAN DER BURGH-DE WINTER und DAEMS 1979). Sekundärgranula, die in den

Knochenmarks- und Blutmonozyten gebildet werden, sind peroxidasenegativ, jedoch katalasepositiv (VAN DER RHEE,DE WINTER und DAEMS 1977), ebenso verfügen die Mikroperoxisomen über eine Katalaseausstattung.
Auf der Basis der Muster der Peroxidase-Aktivität lassen sich auf der einen Seite Monozyten und monozytenstämmige exsudative Makrophagen und auf der anderen Seite Gewebsmakrophagen gegeneinander abgrenzen.
Gewebsmakrophagen des Peritoneums und der Leber (WISSE 1974), der Lunge (SORANZO,KOERTEN und DAEMS 1978), der Milz und des Dünndarms (OGAWA,KOERTEN und DAEMS 1978), der Lymphknoten (HOEFSMIT 1975) und der Haut (KOJIMA 1977) zeigen Peroxidase-Aktivität im rauhen endoplasmatischen Retikulum und im perinukleären Spaltraum (DAEMS und BREDEROO 1973), zuweilen auch im Golgiapparat (COTRAN und LITT 1970, OGAWA,KOERTEN und DAEMS 1978, DAEMS,ROOS, VAN BERKEL und VAN DER RHEE 1979). Die Peroxidase-Aktivität der Gewebsmakrophagen ist in vivo und in Kultivierungsversuchen permanent (BODEL,NICHOLS und BAINTON 1978). Im Gegensatz dazu haben Monozyten eine nachweisbare Peroxidase-Aktivität in Primärgranula und eine Katalase-Aktivität in Sekundärgranula, keinerlei Aktivität wird jedoch im rauhen endoplasmatischen Retikulum und im perinukleären Spaltraum beobachtet (DAEMS und VAN DER RHEE 1980). Exsudative Makrophagen zeigen Aktivität ebenfalls in Granula, die oft länglich und in der Nähe der Golgiregion aufzufinden sind. Diese granuläre Reaktion bei Monozyten und daraus differenzierten Makrophagen ist weder durch eine hohe H_2O_2-Konzentration noch durch KCN oder Aminotriazol zu hemmen (DAEMS und BREDEROO 1973, OGAWA,KOERTEN und DAEMS 1978).
BODEL,NICHOLS und BAINTON (1977,1978) und BEELEN, BROEKHUIS-FLUITSMA,KORN und HOEFSMIT (1978) stellen die Bedeutung des Peroxidasenachweises zur Differenzierung

von Gewebsmakrophagen und von monozytenstämmigen Makrophagen in Frage. Sie finden in oberflächengebundenen Monozyten bzw. in exsudativen Makrophagen ebenfalls Peroxidase-Aktivität im rauhen endoplasmatischen Retikulum und im perinukleären Spaltraum. Diese Aktivität ist allerdings nur vorübergehender Natur (DAEMS und VAN DER RHEE 1980), scheint in vitro jedoch obligat für die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen in Abhängigkeit von der Art des Stimulus und der Mikroumgebung bzw. der angewendeten zytochemischen Methode zu sein. Letztlich führt eine Differenzierung von Monozyten stets zu peroxidasenegativen Zellen (DAEMS und VAN DER RHEE 1980).

Makrophagen des Knochenmarkes sind immer peroxidasenegativ (FEDARKO 1975).

Retikulumzellen des Knochenmarkes und der Milz besitzen im rauhen endoplasmatischen Retikulum und dem perinukleären Spaltraum Peroxidase(OGAWA,KOERTEN und DAEMS 1978), nach YAM,LI und CROSBY (1971) sind Retikulumzellen peroxidasenegativ.

Megakarioblasten zeigen im rauhen endoplasmatischen Retikulum und im perinukleären Spaltraum Peroxidase-Aktivität (BRETON-GORIUS,REYES,DUHAMEL,NAJMAN und GORIN 1978).

Megakariozyten sind nach YAM,LI und CROSBY (1971) und BEGEMANN (1978) peroxidasenegativ; hingegen finden CATOVSKY,CROCKARD,MATUTES und O'BRIAN (1981) in diesen Zellen eine hemmbare Peroxidase.

RUDOLPH (1972) findet in Tumormastzellen des Hundes Peroxidase-Aktivität in den mastzellspezifischen Granula. ROBBINS,FAHIMI und COTRAN (1971) sehen in Mastzellen der Ratte eine schwache Aktivität auch im perinukleären Spaltraum.

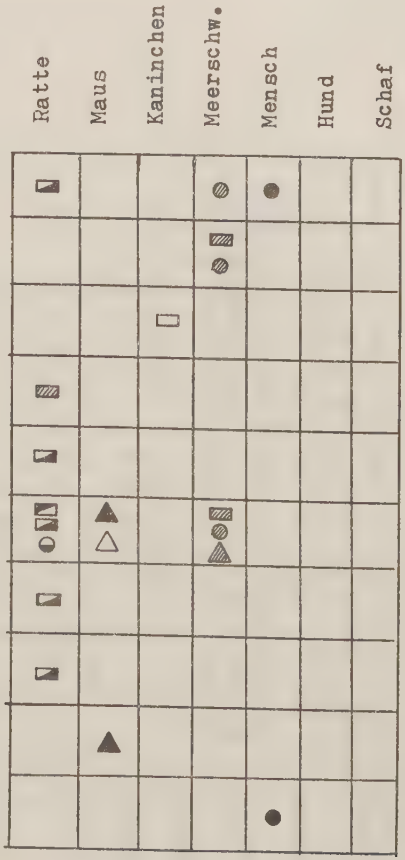
Die Ergebnisse aus der Literatur sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Autorenindex zu Tabelle 2

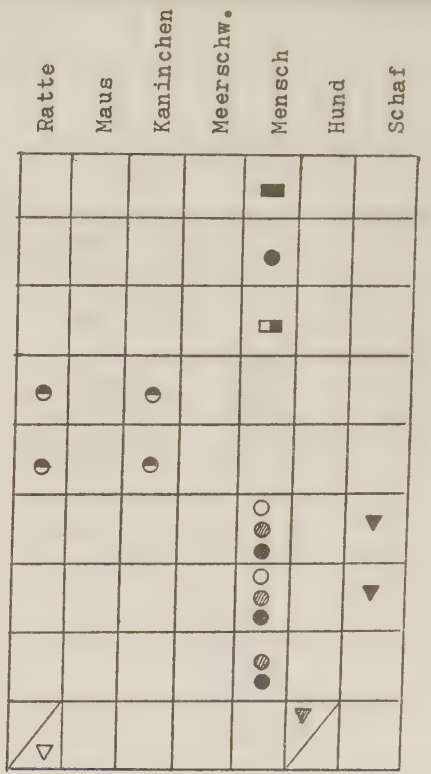
- BODEL,NICHOLS und BAINTON 1978
- BRETON-GORIUS,REYES,DUHAMEL,NAJMAN und GORIN 1978
- CATOVSKY,CROCKARD,MATUTES und O'BRIAN 1981
- CHILOSI,MENESTRINA,PIZZOLO,MACONI,IANNUCCI,BONETTI, und FIORE-DONATI 1981
- COTRAN und LITT 1970
- DAEMS und BREDEROO 1973
- DAEMS 1980
- DAEMS und VAN DER RHEE 1980
- KOJIMA 1977
- MILLER und HERZOG 1969
- OGAWA,KOERTEN und DAEMS 1978
- ROBBINS,FAHIMI und COTRAN 1971
- RUDOLPH 1972
- RUDOLPH und SCHNABL 1979,1981
- SORANZO,KOERTEN und DAEMS 1978
- WISSE 1974
- YAM,LI und CROSBY 1971

Tabelle 2

	Peroxidasereaktion			
	RER	Golgi	perin. Spaltraum	Granula
Monozyt	-	-	-	+
Makrophage, exsudativ	-	-	-	+
	+	-	+	-
	⊕	-	⊕	⊕
Gewebsmakrophage, exs.	+	-	+	+
Gewebsmakrophage	+	+/-	+	-
Epitheloidzelle	-	-	-	+
Riesenzelle	-	-	-	+
Retikulumzelle	+	-	+	-
	-	-	-	-



	Peroxidasereaktion			
	RER	Golgi	perin. Spaltraum	Granula
Megakarioblast	+	-	+	-
Megakariozyt	-	-	-	-
	+	-	+	-
Promyelozyt	+	+	+	-
Myelozyt	+	+	+	-
Granulozyt, eosinophil	-	-	-	+
neutrophil	-	-	-	+
lymphatische Reihe	-	-	-	-
Mastzelle	- / -	- / -	- / +	+ / +



Reaktion: +/- teilweise positiv
+ positiv
⊕ vorübergehend positiv
- negativ

2.2.3.3. Lokalisation und Funktion der Peroxidase

Die Peroxidase katalysiert die Oxidation verschiedener Substrate mit Hilfe des Wasserstoffperoxides.
Die Bedeutung der Myeloperoxidase in neutrophilen Granulozyten in Verbindung mit Wasserstoffperoxid und Halogenen liegt in der Zerstörung von Bakterien, Hefen und Viren (KLEBANOFF und HAMON 1975).
Bio- und zytochemisch besteht zwischen der Peroxidase in den Granula der Monozyten, exsudativen Makrophagen und der Peroxidase der Granula in neutrophilen Granulozyten kaum ein, wenn überhaupt ein Unterschied (DAEMS,ROOS,VAN BERKEL und VAN DER RHEE 1979). Den peroxidasehaltigen Primärgranula wird eine tumorabtötende Aufgabe zugeschrieben (HIBBS 1974), während die Katalase in den Sekundärgranula in Verbindung mit dem Abtöten von Mikroorganismen gebracht wird (KLEBANOFF 1969, KLEBANOFF und HAMON 1975). Die Katalase in Mikroperoxisomen phagozytierender Zellen reguliert die Konzentration intrazellulärer H_2O_2 und gewährleistet damit ein Überleben der Phagozyten (VAN DER RHEE,VAN DER BURGH-DE WINTER und DAEMS 1979).
Ein Mangel an H_2O_2 (KAPLAN,LAXDAL und QUIE 1968) oder an Myeloperoxidase (TERRITO und CLINE 1975) führt zu einer Schwächung bestimmter bakterizider Aktivitäten in Monozyten und neutrophilen Granulozyten.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methode

Für die vorliegende Arbeit werden 120 Histiozytome vom Hund verwendet, die in den Jahren 1976-1984 von tierärztlichen Praxen aus West-Berlin sowie der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin dem Institut für Veterinärpathologie der FU-Berlin zur Untersuchung zugegangen sind. Neun dieser Histiozytome wurden von mir direkt nach der Exstirpation halbiert (etwa linsengroß), die eine Hälfte in flüssigem Stickstoff (-170°C) tiefgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -40°C aufbewahrt, die andere Hälfte wie auch alle anderen Histiozytome in 10%-igem Formalin fixiert und über 24 Stunden mit einem Einbettungsautomaten (Elliot/Shandon) über Alkohol und Xylol in Paraffin eingebettet.

3.1.1. Lichtmikroskopie

3.1.1.1. ALPHA-Naphthylazetat-Esterase, ANAE (Sigma 1977, modif. 1982)

Vom paraffineingebetteten Gewebe werden auf einem Mikrotom (D-Messer) 5 Mikrometer dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte werden anschließend für 24 Stunden bei 37°C in den Brutschrank eingestellt. Zur Entparaffinierung kommen sie für 30 Minuten in ein Xylolbad und werden im Anschluß daran über eine abfallende Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 50%) bewässert und mehrmals in Aqua dest. gespült.
Tiefgefrorenes Tumormaterial wird auf Frigocut (Mod. Nr. 2700/ Reichert) in einer Dicke von 7 Mikrometer geschnitten und auf einen Objektträger aufgezogen. Unmittelbar im Anschluß wird es in einer Zitrat-Azeton-Methanol-Lösung (Sigma: Kit. No. 90-2C oder 90-A1) für 30 Sekunden bei Raumtemperatur fixiert. Die Gefrierschnitte werden kurz in Aqua dest. gewässert.

Inkubationsmedium (Sigma: Kid No. 90-A1):
Substrat: 20mg ALPHA-Naphthylazetat in 2ml Äthylenglykolmonomethyläther lösen.
Koppler: 25mg Echtblausalz RR
Puffer: Trismaleatpuffer, pH 7,6 (50ml)
Inkubation: 90 Minuten unter Lichtabschluß bei 37°C.
Nachbehandlung: 3 Minuten in fließendem Wasser spülen. Gegenfärben mit MAYERs Hämatoxylin (Sigma) für 30 Sekunden, zur Differenzierung 15 Minuten wässern, lufttrocknen und eindecken in Vitroclud (Langenbrink, Emmendingen).
Spezifitätskontrolle:
1. Inkubation ohne Substrat
2. Inhibition der Reaktion durch Natriumfluorid (NaF: 1,5mg/ml Inkubationsmedium).

3.1.1.2. Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase (Sigma 1977, modif. 1982)

Die Vorbehandlung sowohl des paraffineingebetteten als auch des tiefgefrorenen Gewebes entspricht dem bei der ANAE Beschriebenen.

Inkubationsmedium (Sigma: Kid No. 90-2C):
Substrat: 20mg Naphthol-AS-D-Chloroazetat in 2ml Dimethylformamid lösen.
Koppler: 10mg Fast Corinth V Salz
Puffer: 50ml Trismaleatpuffer, pH 6,3
Inkubation: 90 Minuten unter Lichtabschluß bei 37°C.
Nachbehandlung: wie bei der ANAE beschrieben. Zusätzlich wird ein Teil der Gefrierschnitte der Unna-Färbung (ROMEIS 1968) unterzogen.
Spezifitätskontrolle:
Inkubation ohne Substrat.

3.1.1.3. Saure Phosphatase nach BARKA, modif. nach BURSTONE (BARKA und ANDERSON 1963)

Die Gefrierschnitte werden wie bei der ANAE beschrieben angefertigt. Nach dem Aufziehen auf Objektträger werden sie für 5 Minuten luftgetrocknet und anschließend 15 Minuten in Formol-Calzium nach BAKER (4% Formaldehydlösung mit 1% Calziumchlorid) bei 4°C fixiert.

Inkubationsmedium:

Substrat: 25mg Naphthol-AS-BI-phosphat (Sigma) in 2ml Dimethylformamid lösen.

Puffer: 12,5ml Veronal-Azetat Stammlösung zu 30ml Aqua bidest.

4ml hexazotiertes Pararosanilin nach DAVIES und ORENSTEIN (1959)

End-pH des Inkubationsmediums 5,0

Inkubation: 30 Minuten bei 37°C

Nachbehandlung: 2 Minuten in physiologischer NaCl spülen, dann nochmals für 15 Minuten. Gegenfärbung in Hämalaun nach MAYER (Sigma) für 3 Minuten, 10 Minuten in fließendem Wasser differenzieren und eindecken in Glyceringelatine nach KAISER (Merck).

Spezifitätskontrolle:

Inkubation ohne Substrat.

3.1.1.4. Peroxidase nach ROELS, WISSE, DE PREST und VAN DER MEULEN (1975)

Die Gefrierschnitte werden nach dem Aufziehen auf Objektträger kurz luftgetrocknet und ohne Fixierung inkubiert.

Inkubationsmedium:

Substrat: 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (Sigma): 2mg/ml Inkubationslösung

Puffer: Tris-HCl-Puffer 0,1M, pH 7,3

H_2O_2 0,003% Endkonzentration

Inkubation: 1 Stunde bei 21°C.

Nachbehandlung: 3mal 2 Minuten in Aqua dest. spülen, anschliessend 1 Stunde in 1%-igem OsO_4 nachfixieren, erneut 3mal 2 Minuten in Aqua dest. spülen, gegenfärben für 3 Minuten in MAYERs Hämalaun (Sigma), 15 Minuten unter fließend Wasser differenzieren und in KAISERs Glyceringelatine (Merck) eindecken.

Spezifitätskontrolle:

1. Inkubation ohne H_2O_2
2. Hitzeinaktivierung durch Erwärmen des Inkubationsmediums auf 90°C für 3 Minuten

3.1.1.5. Doppelinkubation

Die Einzelschritte werden wie unter den Einzelnachweisen beschrieben durchgeführt.

3.1.1.5.1. ALPHA-Naphthylazetat-Esterase, Nachweis bei 37°C für 30 Minuten, danach Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase bei 37°C für 30 Minuten.

3.1.1.5.2. ALPHA-Naphthylazetat-Esterase, Nachweis bei 37°C für 30 Minuten, anschließend saure Phosphatase für 30 Minuten bei 37°C.

Ein Teil der Gefrierschnitte wird zur vergleichenden Betrachtung der metachromatischen Färbung (Unna-Färbung nach ROMEIS 1968) unterworfen. Vorbehandlung wie bei der ANAE beschrieben.

3.1.2. Elektronenmikroskopie

3.1.2.1. 2-Naphthylthiolazetat-Esterase (PAYNE,KIM,PANGALIS, ROTHMAN und RAPPAPORT 1980)

Von in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Gewebe werden 25 Mikrometer dicke Schnitte (Frigocut: Mod. Nr. 2700,Fa. Reichert) angefertigt und für 2 Stunden bei 4°C in

folgendem Medium fixiert: 2,5% Glutaraldehyd und 2% Paraformaldehyd in Na-Cacodylatpuffer (0,1 M, pH 7,4). Anschließend 3mal 2 Minuten in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer spülen.

Inkubationsmedium:

Substrat: 60mg 2-Naphthylthiolazetat (Serva) in 1ml Azeton lösen.

Koppler: 100mg Echtblausalz BB (Sigma)

Puffer: 49ml Phosphatpuffer, pH 7,4

Inkubation: 6 Stunden bei 21°C

Nachbehandlung: 3mal 2 Minuten in Na-Cacodylatpuffer (0,1 M, pH 7,4) spülen, anschließend 4 Stunden in 1%-igem OsO_4 nachfixieren. Erneut 3mal in Na-Cacodylatpuffer spülen (über Stunden), Dehydrierung über eine steigende Äthanolreihe (50%,70%,96%,100%) und Einbetten in Epon C nach LUFT (1961).

Spezifitätskontrolle:

Inkubation ohne Substrat

3.1.2.2. Peroxidase nach ROELS,WISSE,DE PREST und VAN DER MEULEN (1975)

Die Vorbehandlung, Inkubation und Spezifitätskontrolle entspricht der Methode für die lichtmikroskopische Untersuchung. Die Nachbehandlung erfolgt wie bei 2-Naphthylthiolazetat-Esterase beschrieben.

Alle Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie werden auf einem Ultramikrotom von Reichert (Ultracut) angefertigt. Die Schnitte werden zum Teil mit Uranylazetat und Bleizitrat (VENABLE und COGGESHALL 1965) nachkontrastiert, zum Teil unkontrastiert in einem Elektronenmikroskop (Zeiss, EM 10) untersucht.

4. Ergebnisse

4.1. Epidemiologische Betrachtung des Untersuchungsmaterials

Vorkommen:
67 (55,8%) der 120 untersuchten Histiozytome stammen von männlichen, 53 (44,2%) von weiblichen Tieren.
Altersstruktur (Abb. A):
Die Altersstruktur gliedert sich wie folgt:
unter 6 Monaten: 22 Tiere (18,3%),
6-12 Monate: 43 Tiere (35,8%),
12-24 Monate: 24 Tiere (20%),
über 2 Jahre: 27 Tiere (22,5%),
ohne Angabe des Alters: 4 Tiere (3,4%).
Topographie (Abb. B):
Die Topographie des kutanen Histiozytoms des Hundes (CCH) ergibt folgendes Bild:
Ohne Angaben bleiben 43 Fälle, die restlichen 77 Histiozytome verteilen sich auf den Kopf ohne Ohren mit 19 Fällen (24,7%), auf die Ohren allein mit 24 Fällen (31,1%), auf Hals, Nacken und Brust entfallen 11 der diagnostizierten CCHs (14,3%), die gleiche Anzahl findet sich an den Vorderextremitäten (14,3%), die Hinterextremitäten sind mit 8 Fällen (10,4%), die Flanke mit 3 (3,9%) und das Skrotum mit einem Fall (1,3%) repräsentiert.
Rasse:
109 der eingeschickten Histiozytome stammen von Rassehunden, 11 (9,2%) sind Mischlingen entnommen.
Die am häufigsten betroffene Rasse ist der Boxer mit 26 (23,8%) der 109 von Rassehunden entnommenen Histiozytome. Teckel und Terrier folgen mit je 17 (15,6%), der Cocker erscheint mit 15 Fällen (13,8%).
Ein entnommenes Histiozytom stellt ein Rezidiv dar.

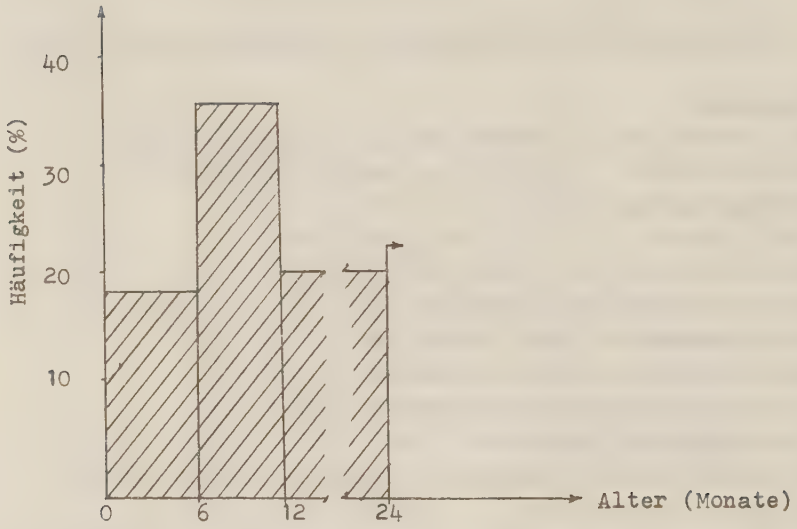


Abb. A: Altersstruktur beim kutanen Histiozytom des Hundes

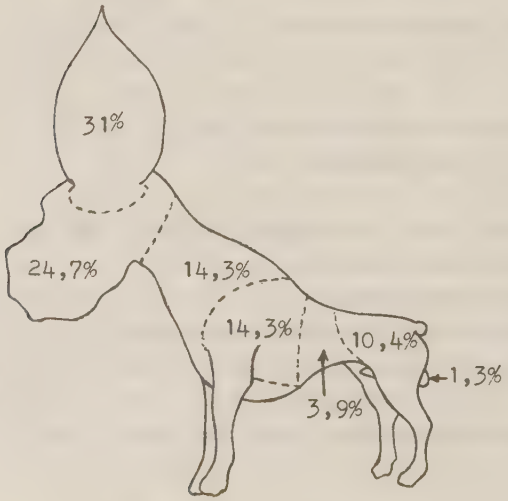


Abb. B : Topographie beim kutanen Histiozytom des Hundes

4.2. Lichtmikroskopie

4.2.1. Paraffineigebettetes Gewebe

4.2.1.1. ALPHA-Naphthylazetat-Esterase

Im gesamten Tumorbereich sind keine Reaktionsprodukte zu erkennen. Die Zellkerne der Histiozytomzellen sind kräftig blau bis hellblau gefärbt, das Zytoplasma ist von einer blassen Blautönung.

4.2.1.2. Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase

Der Nachweis der unspezifischen Esterase mit Naphthol-AS-D-Chloroazetat als Substrat in den Histiozytomzellen gelingt nicht. Das Zytoplasma der Histiozytomzellen weist eine bräunliche Färbung auf, die Kerne sind blau-grau. Eine deutliche Reaktion roter Granula zeigen hingegen die Mastzellen. Ihre Granula liegen dicht gedrängt im Zytoplasma, z.T. verdecken sie die Kernregion. Gewebsnekrosen mit reichlicher Infiltration an Granulozyten setzen sich vom übrigen Gewebsbild durch eine homogene rote Färbung des Zytoplasmas der Granulozyten ab. Kollagenfasern erscheinen rosa.

4.2.2. Kryostatschnitte

4.2.2.1. ALPHA-Naphthylazetat-Esterase

Die Histiozytomzellen sind enzympositiv (Abb. 1). Die Reaktionsprodukte sind als feine, schwarze Granula diffus im Zytoplasma und z.T. auf der Kernregion liegend verteilt (Abb. 2). Die Zellkerne sind blau-violett gefärbt, das Zytoplasma grau-violett unterlegt (Abb. 3). Häufig sind bei diesen Zellen die Reaktionen so heftig, daß dichte Granulawölkchen, den Kern z.T. verdeckend, den gesamten Zellbereich einnehmen.

Bemerkenswerte Unterschiede der Enzymaktivität in hell- oder dunkelkernigen Histiozytomzellen können nicht gesehen werden, ebensowenig lassen sich bezüglich der Reaktivität bestimmte Tumorbezirke hervorheben.
Vereinzelt eingestreute Lymphozyten mit kleinem, runden, dunkelblauen Kern und schmalen Zytoplasmasaum sind gänzlich frei von jeder Enzymaktivität (Abb. 3).
Die Zellen des Stratum germinativum der Epidermis, die Epithelzellen der Haarwurzelscheiden und die Epithelien apokriner Drüsen zeigen reichlich enzymaktive Granula.
Die Enzymaktivität der Epidermis nimmt zum Stratum corneum hin fast vollständig ab (Abb. 1).
Gefäßendothelien und Fibrozyten drücken ihre Enzymaktivität durch feine, diffus verteilte, im Zytoplasma liegende Granula aus. Das reichlich vorhandene Bindegewebe ist homogen grau-braun und weist gelegentlich wie Perlenketten aufgereihte Granula auf.
Segmentkernige Granulozyten, als größere oder kleinere Zellverbände, solitär oder in Gefäßlumina auftretend, sind enzymnegativ.
Nach dem Zusatz von Natriumfluorid kommt es in den hell- und dunkelkernigen Histiozytomzellen zu einer vollständigen oder teilweisen Reduzierung der Reaktionsprodukte. Alle anderen hier beschriebenen Zellen bleiben von der Hemmwirkung des Natriumfluorides unberührt.
Läßt man ALPHA-Naphthylazetat zum Inkubationsmedium weg, so fällt die Reaktion für alle Zellen negativ aus.

4.2.2.2. Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase

Hell- und dunkelkernige Histiozytomzellen zeigen Reaktionsprodukte, die als gut begrenzte, rote Granula ins rötlich-hellgraue Zytoplasma eingebettet sind. Diese Reaktionsprodukte dominieren das Zellbild des CCHs (Abb. 4,5,6,).
Dazwischen liegen einzeln oder in unterschiedlich großen

Zellformationen stark enzymaktive Granulozyten (Abb. 4). Diese Zellgrüppchen stehen dabei in räumlichem Zusammenhang mit oberflächlichen Ulzera und Zellnekrosen oder finden sich in Gefäßlumina und perivaskulären Räumen. Die Reaktion in diesen Zellen erscheint in Form dichtgedrängter rosaroter Granula. Der leuchtend rote Zellkern scheint als segmentierte Struktur durch die Granulation deutlich hindurch.
Mastzellen mit dichten Wölkchen grober roter, den ganzen Zelleib ausfüllenden, Farbstoffgranula, deren Kern nur als zentrale Aufhellung zu erkennen ist, liegen einzeln oder in lockeren Verbänden, meist in der Nähe von Haarbälgen, Drüsen oder der Epidermis. Werden die Kryostatschnitte nach Unna gegengefärbt, so wird unter der starken Esteraseaktivität die für Mastzellen charakteristische metachromatische Färbung ihrer Granula überdeckt.
Epithelzellen der Haarwurzelscheiden und Gefäßendothelien zeigen lediglich eine staubfeine enzympositive Granulation. Drüsenepithelien sind dagegen stark positiv, vor allem an ihren apikalen Polen finden sich grobe rote Granula. Das Stratum germinativum und das Stratum corneum der Epidermis besitzen enzympositive Granula, während dazwischen eine optische Aufhellung zu sehen ist.
Bindegewebszellen sind enzympositiv, die Kollagenfasern haben lediglich eine blaßgrau-braune Grundfärbung.
Wird das CCH ohne Substrat inkubiert, fällt die Reaktion in allen Zellen negativ aus.

4.2.2.3. Saure Phosphatase nach BARKA, modif. nach BURSTONE (BARKA und ANDERSON 1963)

Histiozytomzellen zeigen alle Abstufungen einer Phosphatasereaktion. Einige locker in das Tumorgewebe eingestreute Zellen mit überwiegend großem hellen Kern, zeigen in ihrem

Zytoplasma eine starke diffuse Rotfärbung. Am Rande des rot markierten Zelleibes finden sich hin und wieder große rote Granula. Daneben sieht man zart- bis blaßrot gefärbte Zellen sowohl mit hellem oder auch mit dunklem Kern. Die Reaktion ist auch hier diffus, der polymorphe Kern scheint bei vielen dieser Histiozytomzellen an den Rand gedrängt, so daß es zu einer Polarisierung kommt.
Betrachtet man die Schnitte ohne Gegenfärbung, entsteht an den stark gefärbten Zellen der Eindruck grober bis feingranulärer roter Reaktionsprodukte im diffus blaßrosa Zytoplasma, in dem hin und wieder optisch leere Vakuolen liegen. Ein Teil der Histiozytomzellen zeigt keine lichtmikroskopisch sichtbare Reaktion.
Fest umschriebene Regionen mit starker Granulozyten-infiltration, vor allem um Haarbälge oder perivaskulär oder in Beziehung zur Epidermis gelegen, zeigen eine besonders intensive Rotfärbung. Die segmentierten Kerne der Granulozyten lassen sich unschwer erkennen.
Das Zytoplasma der Fibrozyten ist langgestreckt und überwiegend diffus mit leuchtend rotem Farbstoff angefüllt, bei einigen Zellen lassen sich staubfeine bis grobe Granula erkennen. Häufig ist nur der eine Pol des Zytoplasmas von der Reaktion betroffen, in einigen Zellen wieder der gesamte Zelleib. Der ovale Kern ist meist bei diesen Fibrozyten und -blasten zu erkennen.
Epithelien apokriner Schweißdrüsen sind an ihrem apikal liegenden Zytoplasma diffus zartrot angefärbt.
Die Epidermis zeigt eine blaßrote bis z.T. leuchtend rote Anfärbung des Stratum corneum.
Eine mittelgradig starke, diffuse Reaktion sieht man in den Haarmatrixzellen.
Bemerkenswerte individuelle Unterschiede in Qualität und Quantität der Phosphatasereaktion können nicht gesehen werden.

4.2.2.4. Peroxidase nach ROELS,WISSE,DE PREST und VAN DER MEULEN (1975)

Der Peroxidasenachweis nach ROELS,WISSE,DE PREST und VAN DER MEULEN (1975) zeigt einzelne im Tumorgewebe liegende Zellen mit großem hellen Kern und,in ihrem graugefärbten Zytoplasma liegend, diffus verschwommenes braunes Pigment sowie teilweise braun-schwarze, undeutlich begrenzte Granula. Die meisten Histiozytomzellen zeigen lichtmikroskopisch jedoch keinerlei Reaktionsprodukte.
Gut abgrenzbare Zellverbände unterschiedlicher Größe, die in räumlicher Beziehung zu Nekroseherden, Haarbälgen und Blutgefäßen zu stehen scheinen, sind peroxidasepositiv (Abb. 7). Die Zellkerne der diese Zellverbände bildenden Granulozyten sind deutlich segmentiert und von einer braunen Farbe, das Zytoplasma ist grau gefärbt. Die Peroxidase-Reaktion stellt sich als braunschwarze Granula dar, die z.T. zu Granulahäufchen verbacken scheinen (Abb. 8).
Die Epithelien der apokrinen Schweißdrüsen heben sich vom übrigen Gewebsbild durch die intensive homogene Braunfärbung ab. Wird die Inkubation ohne H_2O_2 durchgeführt, bleibt die Reaktion aus.

4.2.2.5. Doppelinkubation

4.2.2.5.1. ALPHA-Naphthylazetat-Esterase und Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase

Histiozytomzellen mit großen, hellblauen Kernen und reichlich Zytoplasma von bräunlichem Grundton zeigen im Zytoplasma und der Kernregion diffus verteilte Granula von rotschwarzer Mischfarbe (Abb. 10). Das gleiche Bild bezüglich der Reaktion sieht man bei Histiozytomzellen mit dunklem Kern. Einige wenige Zellen mit ausschließlich schwarzer Granulation im Zytoplasma und Kernbereich lassen hier besondere Histiozytomzellen vermuten (Abb. 9a,b).

Lymphozyten, mit einem dunklen Kern und einem schmalen Zytoplasmasaum haben keine oder nur vereinzelt schwarze Granula.
Die Epithelzellen der Haarwurzelscheiden erscheinen mit vornehmlich roter Granulation. Epithelzellen der Epidermis mit Ausnahme des Stratum corneum, welches als rotes Band die Epidermis überzieht, zeigen überwiegend schwarze, granuläre Reaktionsprodukte. Drüsenepithelien sind intensiv schwarz granulär.gefärbt.
Bindegewebszellen stellen sich durch eine rot-schwarze Mischgranulation dar.
Granulozyten mit sehr starker Reaktion roter Granula und deutlich segmentiertem Kern korrespondieren mit Herden ausgedehnter Nekrosen (Abb. 9b).
Starke Infiltrate intensiv rot granulierter Mastzellen finden sich im Bereich der Haarfollikel, teilweise zwischen den Epithelzellen der Haarwurzelscheide und in enger räumlicher Beziehung zur Epidermis oder als solitäre Zellen über das Tumorgewebe verstreut. Die Reaktion in diesen Mastzellen ist deutlich granulär (Abb 10 ,11).
Mischformationen aus Mastzellen und Granulozyten werden häufig, vor allem im Bereich ulzerierender Epidermis, gesehen.

4.2.2.5.2. ALPHA-Naphthylazetat-Esterase und Saure Phosphatase nach BARKA,modif. nach BURSTONE (BARKA und ANDERSON 1963)

Der überwiegende Teil der Histiozytomzellen verfügt über einen homogenen rot eingefärbten Zytoplasmaleib mit eingestreuten, scharf umschriebenen schwarzen Granula. Die Intensität der Phosphataseaktivität kann von einer kaum sichtbaren bis zu einer starken Rotfärbung schwanken(Abb. 12a), während die Esterase-Aktivität bei nahezu allen Histiozytomzellen gleichmäßig stark ausgebildet ist (Abb. 12b).
Daneben existieren Zellen mit einer starken Reaktion der unspezifischen Esterase in Form einer alles überdeckenden

Anhäufung schwarzer Granula, die häufig zu kleinen Kreisen angeordnet, den Eindruck großer Granula mit zentraler Aufhellung vermitteln. Aufgrund der Zellgröße und der Reaktion lassen sich auch hier besondere Histiozytomzellen vermuten.

Fibrozyten und -blasten haben in ihrem überwiegend leuchtend roten Zytoplasma perlkettenartig aufgereihte schwarze Granula eingelagert, z.T. sind sie frei von diesen Granula.

In Zonen starker Zellinfiltration, vor allem durch Granulozyten, wie sie häufig in der Umgebung von Haarbälgen und Nekroseherden gesehen werden, überwiegt der Anteil der Zellen mit ausschließlicher Aktivität an saurer Phosphatase.

Die apokrinen Schweißdrüsen zeigen mit beiden Substraten starke Aktivität, die in die unmittelbare Umgebung einstrahlt. Die apikal gelegenen Drüsenzellen sind leuchtend rot mit zahlreichen schwarzen esterasepositiven Schollen im Zytoplasma, die basal liegenden Zellen sind überdeckt mit schwarzen Granula.

Die Epidermis zeigt in den Zellen aller Schichten mehr oder weniger schwarze Granula, die Zytoplasmaleiber im Stratum basale, spinosum und granulosum sind blaßrosa mit wenigen schwarzen Granula, das Stratum corneum erscheint leuchtend rot.

4.3. Elektronenmikroskopie

4.3.1. 2-Naphthylthiolazetat-Esterase

Der Nachweis der unspezifischen Esterase mit 2-Naphthylthiolazetat als Substrat führt zu elektronenmikroskopisch deutlich sichtbaren Niederschlägen. Dabei kann man prinzipiell feststellen, daß nicht alle Zellen esterase-positiv sind. Die Reaktionsprodukte zeigen in ihrer Elektronendichte unterschiedliche Intensität.
Das Reaktionsprodukt ist bei allen positiven Zellen granulär, das Reaktionsmuster hingegen läßt eine Differenzierung verschiedener Zellen zu. Das Reaktionsprodukt stellt sich als ein unterschiedlich großes Granulum dar mit einem Durchmesser von 0,2-0,8 Mikrometer und mit einem relativ gut definierten Rand (Abb. 16). Viele der enzympositiven Granula sind ganz oder teilweise von einer deutlich sichtbaren Membran umgeben. Der Inhalt der Granula ist homogen, zeigt jedoch eine unterschiedliche Elektronendichte. Die Anzahl und Verteilung der im Zytoplasma liegenden Granula spiegelt die verschiedenen im Histiozytom auftretenden Zellen wieder. In Histiozytomzellen mit kontrastreichem Zytoplasma und einer mikrovillireichen Zytoplasmamembran liegen die Granula in einer kompakten Wolke, die den ganzen Zelleib einnimmt (Abb. 13,14). Der polymorphe Kern ist dabei an den Rand gedrängt. Die Histiozytomzellen mit einem chromatinarmen, mehr oder weniger runden Kern und mit einer mikrovilli-armen Zytoplasmamembran zeigen nur gelentlich einzelne elektronendichte Granula (Abb. 13,14).
Lymphozyten tragen in ihrem schmalen Zytoplasmasaum einzeln oder in kurzen Ketten angeordnet ein bis sechs solcher Granula (Abb. 15), wobei nicht alle Lymphozyten esterase-positive Granula aufweisen.
Monozyten, wie sie ab und zu in Gefäßlumina anzutreffen sind, haben in ihrem Zytoplasma diffus verteilt Granula liegen (Abb. 15). Ihre Zahl ist höher als in den Lymphozyten (Abb. 15).

Drüsenepithelien zeigen auf ihrer basalen Seite einzelne positive Granula, ebenso sind Gefäßendothelien nur schwach enzympositiv in Form vereinzelter Granula.
Neutrophile Granulozyten haben dichtgedrängte elektronendichte Granula in ihrem Zytoplasma. Diese Granula sind, je nach Schnittebene, rund bis oval und von einer deutlichen Membran scharf begrenzt.
Wird das untersuchte Gewebe ohne Substrat inkubiert, fällt die Reaktion negativ aus. In den neutrophilen Granulozyten lassen sich allerdings auch in Kontrollschnitten elektronendichte Granula nachweisen.
Staubfeine schwarze Niederschläge, wie sie in allen Kontrollschnitten über die Zellen gleichmäßig verteilt zu finden sind, treten elektronendichter in gleicher Verteilung und Häufigkeit auch in allen mit Substrat inkubierten Schnitten auf.

4.3.2. Peroxidase nach ROELS,WISSE,DE PREST und VAN DER MEULEN (1975)

Die elektronenmikroskopische Betrachtung der Peroxidasereaktion am kutanen Histiozytom des Hundes bestätigt die bei der Lichtmikroskopie gefundenen Ergebnisse.
Histiozytomzellen mit kontrastreichen, runden Kernen sind durchweg peroxidasenegativ, ebenso jene Histiozytomzellen mit einem hellen, ovalen und z.T. eingekerbten Kern.
Zwischen den Histiozytomzellen eingestreut liegen Zellen mit ovalen, z.T. polymorphen Kernen mit deutlichem Nukleolus, die aufgrund ihres Reaktionsmusters als Makrophagen angesprochen werden. Sie zeigen Peroxidase-Aktivität im perinukleären Spaltraum und an zytoplasmatischen Strukturen, die an das endoplasmatische Retikulum denken lassen (Abb. 17). Im Zytoplasma, soweit es sich zuordnen läßt, liegen zahlreiche Mitochondrien.
Neutrophile Granulozyten, einzeln im Gewebe liegend oder in Verbindung mit Nekrosen als größere Zellverbände

auftretend, verfügen über eine mitunter sehr starke granuläre Reaktion. Die unterschiedlich großen Granula sind z.T. streng umschrieben, von einer Membran umgeben und besitzen homogenen elektronendichten Inhalt. Teilweise sind ihre Konturen verwaschen und weisen eine zentrale Aufhellung auf. In Kontrollschnitten, ohne H_2O_2 inkubiert, zeigen neutrophile Granulozyten ebenfalls elektronendichte Granula.

Eosinophile Granulozyten zeigen diffus im Zytoplasma verteilt liegende runde oder längsovale, charakteristische elektronendichte Granula mit einer zentralen, balkenartigen Aufhellung.

In Fibrozyten und Fibroblasten sowie auch in lymphatischen Zellen ist keine Peroxidase nachweisbar.

Eine Hemmung der Peroxidaseaktivität ergibt sich nach Erwärmung der Schnitte auf 90°C oder nach Inkubation ohne H_2O_2.

5. Diskussion

Der Begriff des kutanen Histiozytoms des Hundes wird erstmals von MOULTON (1961) für einen Tumor mesenchymalen Ursprunges eingeführt. Die Zuordnung unter diesen Begriff erfolgte nach anatomisch-histologischen und epidemiologischen Gesichtspunkten. Obgleich GLICK, HOLSCHER und CAMPBELL (1976) und MOULTON (1961) das Histiozytom des Hundes vom Histiozyten ableiten, bleibt die Erörterung der Histiogenese weiterhin kontrovers (TAYLOR,DORN und LUIS 1969, KELLY 1970, COCKERELL und SLAUSON 1979) und erfordert die Erarbeitung weiterer Merkmale.
VAN FURTH (1980) unterstreicht, daß morphologische Kriterien für die Zuordnung von Zellen nicht ausreichen und fordert zusätzliche Charakteristika, wie z.B. Ergebnisse der Histochemie. Für die Erkennung des Histiozyten besonders geeignet sind der Nachweis der unspezifischen Esterase und der sauren Phosphatase (VAN FURTH 1980), sowie der Nachweis der Peroxidase (DAEMS und BREDERCO 1973, BEELEN,BROEKHUIS-FLUITSMA, KORN und HOEFSMIT 1978, DAEMS und VAN DER RHEE 1980). Histochemische Untersuchungen am kutanen Histiozytom des Hundes werden nur in zwei Mitteilungen erwähnt. GLICK,HOLSCHER und CAMPBELL (1976) weisen im Histiozytom die unspezifische Esterase, KELLY (1970) die saure Phosphatase nach.
In der vorliegenden Arbeit werden neben der ALPHA-Naphthylazetat-Esterase und der Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase die 2-Naphthylthiolazetat-Esterase, die saure Phosphatase und die Peroxidase für eine Charakterisierung und Differenzierung von Histiozytomzellen beim Hund herangezogen.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, daß sich die unspezifische Esterase mittels ALPHA-Naphthylazetat an den histologischen Schnitten paraffineingebetteter Histiozytome des Hundes nicht nachweisen läßt, mittels Naphthol-AS-D-Chloroazetat reagieren lediglich Mastzellen und neutrophile Granulozyten ,unabhängig vom Alter der untersuchten Histiozytome,positiv. Die von mir angefertigten und untersuchten Gefrierschnitte von Histiozytomen des Hundes zeigen hingegen bereits in der Übersichtsvergrößerung eine starke granuläre Esteraseexpression in den Histiozytomzellen mit beiden Substraten.
An der Diskrepanz der Esterase-Aktivität im paraffineingebetteten auf der einen und dem tiefgefrorenen Untersuchungsmaterial auf der anderen Seite zeigt sich die Labilität der unspezifischen Esterasen gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln (HANKER,SEAMAN,WEISS,UENO, BERGMAN und SELIGMAN 1964). Aufgrund dessen ist dem tiefgefrorenen Tumormaterial der Vorzug zu geben. Die unspezifische Esterase läßt sich mit allen in dieser Arbeit eingesetzten Substraten auch noch bei Histiozytomen nachweisen, die bereits 18 Monate eingefroren liegen, ein qualitativer oder quantitativer Unterschied zu frisch entnommenem und kürzer eingefrorenem Untersuchungsgut kann dabei nicht gesehen werden.
In den vorliegenden enzymhistochemischen Untersuchungen an Gefrierschnitten zeigt sich, daß Histiozytomzellen, lichtmikroskopisch sowohl durch ALPHA-Naphthylazetat als auch durch Naphthol-AS-D-Chloroazetat induziert, eine Reaktion der unspezifischen Esterase zeigen. Dieses Ergebnis der doppelten Esteraseexpression stimmt mit Untersuchungen an Histiozyten und Monozyten des Menschen überein (YAM,LI und CROSBY 1971, HORWITZ,ALLISON,WARD und KIGHT 1977, MEURET 1981).
Die Reaktionen unterscheiden sich quantitativ nicht,

qualitativ lediglich in der Farbe ihrer Präzipitate in Abhängigkeit der eingesetzten Substrate und Koppler. Diese Bewertung wird durch die Beobachtung von Mischgranula bei mit ALPHA-Naphthylazetat und Naphthol-AS-D-Chloroazetat doppeltinkubierten Präparate bestätigt. Eine Ausnahme bilden wenige Zellen mit starker ALPHA-Naphthylazetat-Esterase-Reaktion und nur geringer oder fehlender Reaktion mit Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase. Ihr zahlenmäßiges Auftreten und ihre Verteilung entsprechen jenen Zellen, die aufgrund ihres Reaktionsmusters mit der 2-Naphthylthiolazetat-Esterase in der weiteren Diskussion als reife Histiozytomzellen angesprochen werden. Eine diffuse zytoplasmatische Reaktion mit der ANAE in den Histiozytomzellen, wie in der Arbeit von GLICK, HOLSCHER und CAMPBELL (1976) beschrieben, wird in keinem Fall beobachtet. Eine zytologische Zuordnung der Histiozytomzellen des Hundes aufgrund der ultrastrukturellen und zytochemischen Untersuchungen, wie sie GLICK,HOLSCHER und CAMPBELL (1976) vornehmen, erscheint jedoch zweifelhaft, zumal vergleichbare Werte aus der Literatur von Zellen des mononukleären Phagozytensystems erhebliche Speziesunterschiede zeigen. Ein weiteres Problem erschließt sich bei der Betrachtung gesunder und neoplastischer Zellen aus enzymhistochemischer Sicht. So weisen PINKUS, HARGREAVES,MCLEOD,NADLER,ROSENTHAL und SAID (1979) darauf hin, daß neoplastische B-Lymphozyten mitunter eine sehr starke ALPHA-Naphthylazetat-Esterase-Reaktion haben, normale B-Lymphozyten sind hingegen negativ oder nur zu einem geringen Prozentsatz positiv, wenn sie durch geeignete B-Zell Mitogene stimmuliert werden(RANKI,REITAMO,KONTTINEN und HÄYRY 1980).

Neoplastische T-Lymphozyten sind nur dann ALPHA-Naphthylazetat-Esterase-positiv, wenn sie benigne, nicht jedoch maligne sind (CHU,MORGAN und MACDONALD 1981).

Die in der Literatur erwähnten morphologischen und zytologischen Untersuchungen am kutanen Histiozytom des Hundes (KELLY 1970, GLICK,HOLSCHER und CAMPBELL 1976) bewegen sich auf verschiedenen mikroskopischen Ebenen: die zytochemische in der Lichtmikroskopie und die morphologische in der Elektronenmikroskopie. Es scheint daher sinnvoll, sowohl die zytochemische als auch die morphologische Untersuchung der Histiozytomzelle des Hundes am gleichen Gewebe vorzunehmen.
PAYNE,KIM,PANGALIS,ROTHMAN und RAPPAPORT (1980) gelingt es, mit 2-Naphthylthiolazetat in Monozyten des normalen menschlichen Blutes und bei akuter Monozytenleukämie bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung die unspezifische Esterase darzustellen. Das 2-Naphthylthiolazetat verhält sich lichtmikroskopisch ähnlich dem ALPHA-Naphthylazetat (SELIGMAN,UENO,WASSERKRUG und HANKER 1966, PAYNE,KIM,PANGALIS,ROTHMAN und RAPPAPORT 1980). Es scheint deshalb berechtigt, das elektronenmikroskopisch ermittelte Reaktionsbild der 2-Naphthylthiolazetat-Esterase für eine ergänzende Interpretation des entsprechenden lichtmikroskopischen Befundes heranzuziehen.
Die Elektronenmikroskopie erschließt deshalb die Möglichkeit, das lichtmikroskopisch mehr oder weniger einheitlich erscheinende Reaktionsmuster der am Histiozytom des Hundes beteiligten Zellen näher aufzuschlüsseln.
Die Lymphozyten zeigen bei positiver Reaktion ein bis vier, z.T. mehr als vier Einzelgranula im schmalen Zytoplasmasaum, dies steht im Einklang mit den an menschlichen T-Lymphozyten gefundenen Ergebnissen (TOLKSDORF und STEIN 1979, CHU,MORGAN und MACDONALD 1981, ZICCA,LEPRINI,CADONI, FRANZI,FERRARINI und GROSSI 1981). Nach BURGIO,MACCARIO, RAFFAELLA und UGAZIO (1981) und ZICCA,LEPRINI,CADONI, FRANZI,FERRARINI und GROSSI (1981) lassen sich diese Zellen anhand des Reaktionsmusters den T_M-Lymphozyten, einer Subpopulation der T-Lymphozyten mit Helferzellfunktion,

zuordnen. Beide Autorenteams sehen eine Verbindung zwischen den punktförmigen, paranukleär gelegenen Reaktionsprodukten und Primärlysosomen, während T_G-Lymphozyten eine diffuse Reaktion im Bereich der Golgiregion haben.
Monozyten besitzen locker im Zytoplasma verteilte esterasepositive Granula,auch dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von PAYNE,KIM,PANGALIS,ROTHMAN und RAPPAPORT (1980), die sie bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an menschlichen Blutzellen gewonnen haben.
Bei den Histiozytomzellen des Hundes scheint es im Sinne einer Arbeitshypothese zweckmäßig zu sein, in Anlehnung an die Arbeit von KELM (1982), eine Differenzierung vorzunehmen. Reife Histiozytomzellen zeichnen sich nach KELM (1982) durch zahlreiche Mitochondrien, einiges rauhes endoplasmatisches Retikulum, Vesikel und Lysosomen aus. Die Zellmembran enthält entweder keine, wenige plumpe oder zahlreiche Mikrovilli.
Die vorliegende Arbeit zeigt elektronenmikroskopisch bei der 2-Naphthylthiolazetat-Esterase in der reifen Histiozytomzelle eine Vielzahl von Präzipitaten in Form zufällig in das Zytoplasma eingestreuter Granula unterschiedlichen Durchmessers. Nicht alle Granula verfügen über eine Membran, ihre Begrenzung erscheint häufig undeutlich. Hier kommt es offensichtlich durch den Verzicht auf Fixierung des Gewebes vor dem Einfrieren zu einer vollständigen oder teilweisen Lysis der Membran mit Austritt der Esterase in das Zytoplasma.
Undifferenzierte Histiozytomzellen zeigen nach KELM (1982) wenig Membranausstülpungen, haben ein helles Zyto- und Karioplasma und wenig Zellorganellen.
In undifferenzierten Histiozytomzellen gelingt der Nachweis der unspezifischen Esterase nur an wenigen Granula.
Die an den reifen und undifferenzierten Histiozytomzellen des Hundes erstellten Befunde mit der 2-Naphthyl-

thiolazetat-Esterase verifizieren die lichtmikroskopischen Ergebnisse der Doppelinkubation mit der ALPHA-Naphthylazetat- und der Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase: Während der überwiegende Teil der Histiozytomzellen eine überschaubare Anzahl rot-schwarzer esterasepositiver Granula besitzt, zeigen einige der Histiozytomzellen eine sehr starke granuläre Reaktion ausschließlich mit ANAE. Diese letztgenannten Zellen stimmen offensichtlich mit den stark esterasepositiven reifen Histiozytomzellen aus der elektronenmikroskopischen Untersuchung überein.
Unter der Voraussetzung, daß sich die Histiozytomzellen des Hundes von Histiozyten ableiten lassen, die sich ihrerseits aus Monozyten differenzieren, würde die starke Aktivitätszunahme der unspezifischen Esterase, wie sie in dieser Arbeit in den reifen Histiozytomzellen des Hundes im Vergleich zu in den Gefäßen gefundenen Monozyten zu beobachten ist, mit Ergebnissen aus der Literatur korrelieren: So beschreiben MÜLLER-HERMELINK und KAISERLING (1980) eine Aktivitätszunahme bei Alveolarmakrophagen (aktivierte Makrophagen) des Menschen im Vergleich zu Blutmonozyten, während Epitheloidzellen, die sich durch Lymphokine induziert aus Monozyten und/oder Makrophagen entwickeln, eine nur mäßig höhere Aktivität als Monozyten und Makrophagen zeigen.
Die von KELM (1982) beschriebene undifferenzierte Histiozytomzelle bereitet bei ihrer zytogenetischen Einordnung Schwierigkeiten. Eine von der Autorin diskutierte Möglichkeit sieht die undifferenzierte als Vorläufer der reifen Histiozytomzelle. Das würde bedeuten, daß es mit der Transformation oder Reifung der Histiozytomzelle zu einer Zunahme esterasepositiver Granula kommt. Eine derartige Änderung des Reaktionsmusters der unspezifischen Esterase mit der Reifung einer Zelle wird vielfach in der Literatur beschrieben. So sehen MUELLER,BRUN DEL RE,BUERKI, KELLER,HESS und COTTIER (1975) und KNOWLES II und HALPER (1980) bei unreifen Thymozyten der Maus, die im Cortex

liegen, keine ALPHA-Naphthylazetat-Esterase, hingegen bei medullären Thymozyten und auch bei peripheren T-Lymphozyten die häufig beschriebenen ein bis drei punktförmigen Präzipitate im schmalen Zytoplasma.
MYSLIWSKA,WITKOWSKI und MYSLIWSKA (1980) beschreiben in ihrer Arbeit zusätzlich eine qualitative Änderung des Enzymmusters bei murinen Thymozyten von diffus nach granulär unter Hydrocortisoneinfluß. Nach ihren Beobachtungen werden unreife Zellen durch Kortisone eliminiert. BASSO, COCITO,SEMENZATO,PEZZUTTO und ZANESCO (1980) ziehen zwischen Zunahme der ALPHA-Naphthylazetat-Esterase-Aktivität bei menschlichen zirkulierenden T-Lymphozyten während der Zellreifung und einer Abnahme von C_3-Rezeptoren auf der Zelloberfläche eine Parallele. Unstimmulierte B-Lymphozyten, die ständig einen C_3-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche tragen, sind folgerichtig auch stets esterasenegativ.
HORWITZ,ALLISON,WARD und KIGHT (1977) gelingt es, durch Kultivierung mononukleärer Zellen aus dem menschlichen Blut nach 48 Stunden einen bemerkenswerten Zuwachs enzympositiver Monozyten zu bekommen. Sie deuten dies als Reifung von enzympositiven Monozyten aus deren enzymnegativen Zellvorläufern. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kommen auch MEURET (1978) bei Untersuchungen an menschlichen Zellen des mononukleären Phagozytensystems und KLASEN (1983) an kultivierten Hühnermonozyten.
Kontrovers bleibt bisher die Deutung der Lokalisation der unspezifischen Esterase.
ZICCA,LEPRINI,CADONI,FRANZI,FERRARINI und GROSSI (1981) finden bei licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen an menschlichen T-Lymphozyten eine membrangebundene Reaktion der ALPHA-Naphthylazetat-Esterase. Die gleichen Vesikel beinhalten auch saure Phosphatase, die nach BUCHER (1973) und nach GROH und MAYERSBACH (1981) als Marker für Lysosomen gelten kann. Weiterhin

stützt das Autorenteam seine Feststellung auf die Beobachtung, daß diese Vesikel mit einer Einheitsmembran umgeben sind. Es kommt zu dem Resultat, daß die esterasepositiven Granula mit primären Lysosomen identisch sind. STERRY,STEIGLEDER und PULLMANN (1980) kommen beim Nachweis der ALPHA-Naphthylazetat-Esterase in Lymphozyten, Monozyten und Histiozyten aus menschlichen Hautbiopsien zu dem gleichen Schluß. Sie sehen außerdem eine Übereinstimmung von paranukleär aggregierten Lysosomen in T-Lymphozyten mit in gleicher Position sowie Konfiguration liegenden esterasepositiven Granula. Andere Autoren finden für die unspezifische Esterase in Abhängigkeit vom Substrat weitere intrazelluläre Lokalisationen. So können VON DEIMLING und MADREITER (1972) im rauhen endoplasmatischen Retikulum, BÖCKING (1974) ebenfalls im rauhen endoplasmatischen Retikulum, ferner in Mitochondrien und im perinukleären Spaltraum von Mäuse- und Rattenleberzellen Esterase-Aktivität nachweisen. PAYNE,KIM,PANGALIS,ROTHMAN und RAPPAPORT (1980) gelangen bei ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit 2-Naphthylthiolazetat an Histiozyten und Lymphozyten menschlicher Lymphgewebe und Blutmonozyten zu der Auffassung, daß die unspezifische Esterase topographisch keinen Zellorganellen zugeordnet werden kann, wenngleich eine enge räumliche Beziehung zu Lysosomen besteht; außerdem übersteige besonders bei Histiozyten die Zahl esterasepositiver Granula diejenige der Lysosomen bei weitem.

Einen auffälligen Mengenunterschied zwischen enzympositiven Granula in esterasepositiven Histiozytomzellen und Lysosomen von Histiozytomzellen aus entsprechenden Kontrollschnitten kann in der vorliegenden Arbeit in keinem Fall gesehen werden. Auch die Feststellung von KELLY (1970), daß alle mononukleären Zellen des kutanen Histiozytoms des Hundes keine saure Phosphatase enthalten, kann nicht bestätigt werden. Die phosphatase- und esterasepositiven Zellen scheinen vielmehr im kutanen Histiozytom des Hundes

häufig identisch zu sein, wie sich aus der durchgeführten Doppelinkubation mit ALPHA-Naphthylazetat und der sauren Phosphatase ersehen läßt. Infiltratzellen mit Gehalt an saurer Phosphatase, die mehr oder weniger in jedem untersuchten Histiozytom auftreten, sind Granulozyten und stehen im Zusammenhang mit Nekroseherden, wie sie in unterschiedlichen Ausmaßen im Histiozytom anzutreffen sind (COCKERELL und SLAUSON 1979).

In Übereinstimmung mit einer Lokalisation der unspezifischen Esterase in Lysosomen steht die ultrastrukturelle Erkennung einer Membran um viele der esterasepositiven Granula. Daß diese Membran nicht immer gesehen wird, kann an der Diffusion des Enzyms durch die Membran in das umgebende Zytoplasma, wie es ZICCA,LEPRINI,CADONI,FRANZI,FERRARINI und GROSSI (1981) an menschlichen T-Lymphozyten sehen, oder auch an einer partiellen Auflösung der Membran infolge der Vorbehandlung des bei der vorliegenden Untersuchung verwendeten Tumorgewebes liegen.

Die große Zahl möglicher Lysosomen in den Histiozytomzellen des Hundes steht im Widerspruch zu Beobachtungen von KELLY (1970), der aufgrund einer geringen Ausstattung der Histiozytomzellen mit Lysosomen und anderer Zellorganellen weder eine Pinozytose noch eine Phagozytose in diesen Zellen für möglich hält. Hinsichtlich der Feinstruktur stimmt er mit der Beschreibung der reifen Histiozytomzellen durch KELM (1982) überein. Diese Zellen ähneln jenen, die in der vorliegenden Arbeit stark esterasepositiv sind. Möglicherweise handelt es sich bei der reifen Histiozytomzelle doch um eine aktive Zellfraktion innerhalb der Histiozytomzellen, zumal lange und zahlreiche Zellausläufer mit einer starken Phagozytoseaktivität im Zusammenhang stehen können (CARR 1973).

Häufig wird auch die Peroxidase zur Differenzierung von Zellen des mononukleären Phagozytensystems eingesetzt (DAEMS und BREDEROO 1973, BEELEN,BROEKHUIS-FLUITSMA,KORN und HOEFSMIT 1978). Die Autoren unterscheiden verschiedene Reifungsstadien mononukleärer Zellen und treffen eine Zuordnung der Zellen anhand des gefundenen Reaktionsmusters. Eine Unterscheidung von zwei Histiozytomzellen, wie sie bei der ultrastrukturellen Betrachtung mit der unspezifischen Esterase möglich ist, läßt sich in der vorliegenden Arbeit mit der endogenen Peroxidase nicht treffen. Alle reifen und auch undifferenzierten Histiozytomzellen zeigen keinerlei Peroxidaseaktivität. Das Fehlen der Peroxidaseaktivität schließt jedoch eine Beziehung der Histiozytomzellen des Hundes zum System der mononukleären Phagozyten nicht aus. So kommt es z.B. nach der Differenzierung von Epitheloid- oder Riesenzellen aus Makrophagen zu einem Verlust der Primär- und Sekundärgranula und damit der endogenen Peroxidase, während die Anzahl der Mikroperoxisomen mit Katalase-Aktivität zunimmt (DAEMS und BREDEROO 1973, VAN DER RHEE, VAN DER BURGH-DE WINTER und DAEMS 1979). Durch den Peroxidasenachweis an unfixiertem Gewebe ist davon auszugehen, daß Katalase, die erst durch eine besondere Vorbehandlung bzw. Fixierung aktiviert wird, weitgehend unterdrückt ist (LOJDA,GOSSRAU und SCHIEBLER 1976).
Ob es in den Histiozytomzellen ebenfalls zu einem Verlust der Primärlysosomen kommt, ist, in Anbetracht der Tatsache, daß auf der einen Seite diese Strukturen von GROH und MAYERSBACH (1981) und von STERRY,STEIGLEDER und PULLMANN (1980) als Sitz der unspezifischen Esterase erkannt werden, auf der anderen Seite ja gerade die reifen Histiozytomzellen viele esterasepositive Granula besitzen, schwer zu sagen. Denkbar ist der Verlust der Peroxidaseaktivität in den Lysosomen.
Die mehr oder weniger zahlreich zwischen den peroxidase-negativen Histiozytomzellen liegenden Zellen mit deutlicher Peroxidase-Aktivität entsprechen in ihrem Reaktions-

muster den Gewebsmakrophagen (COTRAN und LITT 1970, DAEMS und BREDEROO 1973, OGAWA,KOERTEN und DAEMS 1978, WISSE 1974, KOJIMA 1977, SORANZO,KOERTEN undDAEMS 1978, DAEMS 1980, DAEMS und VAN DER RHEE 1980). Sie besitzen eine deutliche Aktivität im perinukleären Spaltraum und an Strukturen, die an das endoplasmatische Retikulum denken lassen. Ihr Kern ist oval, teilweise lobuliert oder sogar polymorph. Ein Zusammenhang zwischen diesen Zellen und den in dieser Arbeit beschriebenen reifen Histiozytomzellen mit starker Esterase-Aktivität scheint wegen des zahlenmäßigen Unterschiedes nicht zu bestehen. Vielmehr ist denkbar, daß es sich dabei um Gewebsmakrophagen handelt, die nur mittelbar am Histiozytomgeschehen beteiligt sind.
Die zahlreichen, das Gewebe infiltrierenden neutrophilen Granulozyten zeichnen sich deutlich durch ihre peroxidasepositiven Granula und durch den segmentierten Kern aus. Eosinophile Granulozyten, die selten angetroffen werden, fallen durch ihre charakteristischen peroxidasepositiven Granula auf.
Die vorliegenden Ergebnisse am kutanen Histiozytom des Hundes lassen eine zweifelsfreie zytologische Zuordnung der Histiozytomzellen nicht zu, zumal es sich morphologisch (KELM 1982)und zytochemisch um keine einheitliche Zellpopulation handelt. KELLY (1970), GLICK,HOLSCHER und CAMPBELL (1976) sehen in ihren Arbeiten die Histiozytomzellen morphologisch und zytochemisch als einheitliche Population von Zellen. Vergleiche mit den aus dem Schrifttum gewonnenen Werten für die sauren Hydrolasen (ALPHA-Naphthylazetat-Esterase, Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase, 2-Naphthylthiolazetat-Esterase) und die Peroxidase lassen jedoch an das mononukleäre Phagozytensystem denken.
Erschwerend bei einer vergleichenden Betrachtung kommt allerding hinzu, daß über das enzymhistochemische Verhalten neoplastischer Zellen, speziell vom Hund, nur

sehr wenig bekannt ist.
So stellt diese Arbeit einen Beitrag zur enzymhistochemischen Charakterisierung der Zellen des kutanen Histiozytoms des Hundes dar, wobei diese Ergebnisse erst nach Gewinnung weiterer Erkenntnisse relativiert werden können.

6. Zusammenfassung

Die Zellen des kutanen Histiozytoms des Hundes werden lichtmikroskopisch auf ihren Gehalt an ALPHA-Naphthylazetat-Esterase, Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase, saure Phosphatase und Peroxidase sowie elektronenmikroskopisch auf 2-Naphthylthiolazetat-Esterase und Peroxidase untersucht. Für diese Untersuchungen werden sowohl paraffineingebettete als auch in flüssigem Stickstoff (-170°C) tiefgefrorene Histiozytome vom Hund verwendet.
Es zeigt sich, daß paraffineingebettetes Gewebe für die engere Fragestellung dieser enzymhistochemischen Untersuchungen nicht geeignet ist.
Lichtmikroskopisch läßt sich mittels Kryostatschnitte in den Histiozytomzellen sowohl die ALPHA-Naphthylazetat-Esterase als auch die Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase als Granula darstellen, die saure Phosphatase als homogene zytoplasmatische Reaktion. Peroxidase-Aktivität findet sich nicht in Histiozytomzellen, wohl aber in infiltrierenden Granulozyten.
Elektronenmikroskopisch kann anhand der Qualität der 2-Naphthylthiolazetat-Esterase-Reaktion eine Differenzierung der Histiozytomzellen in zwei Populationen vorgenommen werden: als reif angesehene, stark esterasepositive und als undifferenziert angesehene, schwach esterasepositive Histiozytomzellen. Monozyten zeigen wenige, Lymphozyten ein bis vier im Zytoplasma liegende Granula. Die Esterase-Reaktion scheint an Lysosomen gebunden zu sein. Die Histiozytomzellen sind frei von Peroxidase-Aktivität. Peroxidase findet sich in den wenigen im Tumorgewebe liegenden Makrophagen im perinukleären Spaltraum und an Strukturen, die in räumlicher Beziehung zum endoplasmatischen Retikulum stehen.
Eine Beziehung zum mononukleären Phagozytensystem ist wahrscheinlich, jedoch reichen die gefundenen zytochemischen Kriterien für eine zytogenetische Zuordnung der Histiozytomzelle des Hundes noch nicht aus.

7. Summary

Cells of the canine cutaneous histiocytoma were investigated by light-microscopy for their activity of alpha-naphthyl acetate esterase, naphthol-as-d-chloroacetate esterase, acid phosphatase and peroxidase and by electron-microscopy for their activity of 2-naphthylthiol acetate esterase and peroxidase. For these enzyme histochemical examinations paraffin-embedded sections as well as cryostat sections have been applied. Paraffin-embedded sections showed to be not usefull for demonstration of the nonspecific esterases in histiocytoma cells.

In cryostat sections on lightmicroscopical level histiocytoma cells showed granular reaction with alpha-naphthyl acetate esterase and naphthol-as-d-chloroacetate esterase and a homogene cytoplasmatic reaction with acid phosphatase. Peroxidase reaction was not detected within histiocytoma cells, whereas infiltrating granulocytes showed a strong peroxidatic activity.

Ultrastructural two populations of histiocytoma cells can be differentiated by the enzyme histochemical feature of 2-naphthylthiol acetate esterase activity:: mature histiocytoma cells with strong granular esterase activity and undifferentiated histiocytoma cells with little or no granular esterase activity. Monocytes show some, lymphocytes 1-4 distinct granules. The esterase reaction seems to be a lysosomal reaction. The histiocytoma cells express no peroxidase activity. Few cells with peroxidase activity localized in the perinuclear cisternae and in segments of the rough endoplasmatic reticulum thought to be macrophages.

In spite of the enzyme histochemical findings the origin of the histiocytoma cells remains obscure, whereas some characteristics are evidence that these cells originate from the mononuclear phagocyte system.

8. Literaturverzeichnis

BAKKER,J.M. DE,NOORDENDE,J.M. VAN'T und W.T.DAEMS (1980)
The existence of a peritoneal resident macrophage population as studied by Imferon-treated mice
In: Electron microscopy, Vol. 2, Biology p. 192
Ed. BREDEROO,P. und W.PRIESTER,DE
The Hague

BAKKER,J.M. DE, WIT,A.W. DE und W.T.DAEMS (1981)
The relationship between monocytes and resident (tissue) macrophages
In: Disorders of the monocyte macrophage system, Vol. 27
Haemotology and Blood Transfusion, p 79-87
Ed. SCHMALZL,F., HUHN,D. und H.E.SCHAEFER
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

BAINTON,D.F. und M.G.FARQUHAR (1970)
Segregation and packageing of granule enzymes in eosinophilic leucocytes
J. Cell Biol. 45, 54

BARKA,T. und P.J.ANDERSON (1963)
Histochemistry. Theory, practice and bibliography.
Hoeber Medical Division New York, Evanston and London

BASSO,G., COCITO,M.G., SEMENZATO,G., PEZZUTTO,A. und L.ZANESCO (1980)
Cytochemical Study of Thymocytes and T Lymphocytes
Br. J. Haematol. 44, 577-582

BEELEN,R.H.J. (1981)
Development of exsudate-resident macrophages in vivo and in vitro
In: Disorders of the macrophage system, Vol. 27
Haematology and Blood Transfusion, p 89-100
Ed. SCHMALZL,F., HUHN,D. und H.E.SCHAEFER
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

BEELEN,R.H.J., BROEKHUIS-FLUITSMA,D.M., KORN,C. und E.C.M. HOEFSMIT (1978)
Identification of exsudate-resident macrophages on the basis of peroxidatic activity
J. Reticuloendothel Soc. 24, 355

BEELEN,R.H.J., FLUITSMA,D.M. und E.C.HOEFSMIT (1980)
Peroxidatic activity of mononuclear phagocytes developing in omentum milky spots
J. Reticuloendothel Soc. 28, 601

BEGEMANN,H. (1978)
Atlas der klin. Hämatologie, 3.Auflage
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

BODEL,P.T., NICHOLS,B.A. und D.F.BAINTON (1977)
Appearance of peroxidatic reactivity within the rough endoplasmic reticulum of blood monocytes after surface adherence
J. Exp. Med. 145, 264

BODEL,P.T., NICHOLS,B.A. und D.F.BAINTON (1978)
Differences in peroxidase localization of rabbit peritoneal macrophages after surface adherence
Am. J. Pathol. 91, 107

BÖCKING,A. (1974)
Biochemical and Ultrahistochemical Investigations of the Non Specific Esterase in Nuclei from Mouse Liver
Histochem. 41, 313

BRAUNSTEIN,H. (1958)
Esterase in leucocytes
J. Histochem. Cytochem. 7, 202

BRETON-GORIUS,J., REYES,F., DUHAMEL,G., NAJMAN,A. und N.C.GORIN (1978
Megacarioblastic Acute Leucemia: Identification by the Ultrastructural Demonstration of Platalet Peroxidase
Blood 51, 45-60

BUCHER,O. (1973)
Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen
8. Auflage, S. 32
Verlag Hans Huber, Bern Stuttgart Wien

BURGIO,V.L., MACCARIO,R., RAFFAELLA,R. und A.G.UGAZIO (1981)
Golgi-ANAE positivity in leucemic blast cells: A possible
T-suppressor cell leucemia
Acta haema. 66, 122-126

BURSTONE,M.S. (1957)
Esterase activity of developing dones and teeth
Arch. Pathol. 63, 164-167

CARR,I. (1973)
The macrophage. A review of ultrastructure and function
Academic Press, New York and London

CATOVSKY,D. und C.COSTELLO (1979)
Cytochemistry of normal and leukemic lymphocytes: A review
Bas. Appl. Histochem. 23, 255-270

CATOVSKY,D., CROCKARD,A.D., MATUTES,E. und M.O'BRIAN (1981)
Cytochemistry of leukemic cells
In: Histochemistry: The widening horizons
Ed. STOWARD,P.J. und J.M.POLAK
John Wiley and Sons Ltd.

CHILOSI,M., MENESTRINA,F., PIZZOLO,G., MACONI,A., IANNUCCI,A.,
BONETTI,F. und L.FIORE-DONATI (1981)
Fluoride resistent alpha-näphthyl acetate esterase and combined
enzyme histochemistry in the study of normal and pathologic
lymphoid tissues
Bas. Appl. Histochem. 25, 39-50

CHILOSI,M., PIZZOLO,G., MENESTRINA,F., IANNUCCI,A., BONETTI,F. und L.FIORE-DONATI (1981)
Enzyme histochemistry on normal and pathologic paraffin-embedded lymphoid tissues
Am. J. Clin. Pathol. 76, 729-736

CHU,A.C., MORGAN,E.W. und D.M.MACDONALD (1981)
Evaluation of acid alpha-naphthyl acetate esterase activity as a marker of T lymphocytes in benign and neoplastic cutaneous infiltrate
Brit. J. Dermatol. 104, 31-37

COCKERELL,G.L. und D.O.SLAUSON (1979)
Patterns of lymphoid infiltrates in the canine cutaneous histiocytoma
J. Comp. Pathol. 89, 193-203

COTRAN,R.S. und M.LITT (1970)
Ultrastructural lokalization of horseradish peroxidase and endogenous peroxidase activity in guinea pig peritoneal macrophages
J. Immunol. 105, 1536-1545

DAEMS,W.T. (1980)
Peritoneal macrophages
In: The reticuloendothelial system, Vol. 1, Morphology, p 57
Plenum, New York London

DAEMS,W.T. und P.BREDEROO (1973)
Electron microscopical studies on the structure, phagocytic properties and peroxidatic activity of resident and exsudate peritoneal macrophages in the guinea pig
Z. Zellforsch. 144, 247-297

DAEMS,W.T. und H.K.KOERTEN (1978)
The effect of various stimuli on the cellular composition of peritoneal exsudates in the mouse
Cell Tissue Res. 190, 47

DAEMS,W.T. und H.J.VAN DER RHEE (1980)
Peroxidase and catalase in monocytes, macrophages, epitheloid cells and giant cells of the rat
In: Mononuclear phagocytes. Functional aspects. Part I, 43-60
Ed. R. VAN FURTH
Martinus Nijhoff Publishers. The Hague Boston London

DAEMS,W.T., ROOS,D., BERKEL,T.J.C. VAN und H.J.VAN DER RHEE (1979)
The subcellular distribution and biochemical properties of peroxidase in monocytes and macrophages
In: Frontier of biology, Vol. 48. Lysosomes in biology and pathology
Lysosomes in applied biology and therapeutics. Part 6, 463-514
Ed. DINGLE,J.D., JACQUES,P.J. und I.H.SHAW
North Holland Publishing Comp. Amsterdam New York Oxford

DAVIES,B.J. und L.ORENSTEIN (1959)
High resolution enzyme localization with new diazo reagent, "hexazonium pararosaniline"
J. Histochem. Cytochem. 7, 297-298

DEIMANN,W. (1984)
Endogenous peroxidase activity in mononuclear phagocytes
Prog. in Histochem. Cytochem., Vol. 15, No. 2
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart New York

DEIMANN,W. und H.D.FAHIMI (1977)
The ontogeny of mononuclear phagocytes in fetal rat liver using endogenous peroxidase as a marker
In: Kupffer cells and other sinussoidal cells, p 487
Ed. WISSE,E. und D.L.KNOOK
Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam

DEIMLING,O. VON und H.MADREITER (1972)
Demonstration of an as yet Histochemically unknown Thiolesterase by means of Light and Electron Microscopy
Histochem. 29, 340-354

DESAGA,J.F., PARWARESCH,M.R. und H.K.MÜLLER-HERMELINK (1971)
Die zytochemische Identifikation der Mastzellenvorstufen bei der Ratte
Z. Zellforsch. 121, 292-300

FAHIMI,H.D. (1970)
The fine structural localization of endogenous and exogenous peroxidase activity in Kupffer cells of rat liver
J. Cell Biol. 47, 247-262

FEDARKO,M.E. (1975)
Morphological and functional characteristics of bone marrow macrophages from Imferon-treated mice
Blood 45, 435-449

FERLUGA,J., ASHERSON,G.L. und E.L.BECKER (1972)
The effect of organophosphorus inhibitors, p-nitrophenol and cytochalasin-B on cytotoxic killing of tumour cells by immune spleen cells and the effect of shaking
Immunol. 23, 577-590

FERRARINI,F.A., MACCARIO,R., MARCONI,M., VITIELLO,M.A., UGAZIO,A.G., BURGIO,V. und A.G.SICCARDI (1980)
Reliability of alpha-naphthyl acetate esterase staining of blood smears for the enumeration of circulating human T lymphocytes
Clin. exp. Immunol. 41, 358-362

FURTH,R. VAN (1980)
Cells of the mononuclear phagocyte system. Nomenclatur in terms of sites and conditions
In: Mononuclear phagocytes. Functional aspects. PartI, 1-30
Ed. by FURTH,R. VAN
Martinus Nijhoff Publishers. The Hague Boston London

FURTH,R. VAN (1981)
Current view of the mononuclear phagocyte system
In: Disorders of the monocyte macrophage system, p 3-10
Haematology and Blood Transfusion, Vol. 27
Ed. SCHMALZL,F., HUHN,D. und H.E.SCHAEFER
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

GLICK,A.D., HOLSCHER,M. und G.R.CAMPBELL (1976)
Canine cutaneous histiocytoma: Ultrastructural and cytochemical observation
Vet. Pathol. 13, 374-380

GÖSSNER,W (1958)
Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode
Untersuchungen zur Methodik und vergleichende Histoptik der Esterasen und Phosphatasen bei Wirbeltieren
Histochem. 1, 48-96

GOMORI,G. (1953)
Chloroacyl esters as histochemical substrates
J. Histochem. Cytochem. 1, 469-470

GRAHAM,R.C. und M.J.KARNOVSKY (1966)
The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique
J. Histochem. Cytochem. 14, 291-302

GROH,V. und H.MAYERSBACH (1981)
Enzymatic and functional heterogenity of lysosomes.
Cell Tiss. Res. 214, 613-621

HANKER,J.S., SEAMAN,A.R., WEISS,L.P., UENO,H.,BERGMAN,R.A. und A.M.SELIGMAN (1964)
Osmiophilic reagents: New cytochemical principle for light and electron microscopy
Science 146, 1039-1043

HELMIN,D. und CHR.SAAR (1984)
Morphologische Untersuchung am Monozyten des Hundes
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 97, 13-18

HIBBS,J.B. (1974)
Heterocytolysis by macrophages activated by Bacillus Calmette-Guerin: Lysosome exocytosis into tumour cells
Science 184, 468-471

HIBBS,J.B., LAMBERT,L.H. und J.R.REMINGTON (1972)
Possible role of macrophage mediated nonspecific cytotoxicity in tumour resistance
Nature (Lond.) New Biol. 235, 48-50

HOEFSMIT,E.C.M. (1975)
Mononuclear phagocytes, reticulum cells and dentritic cells in lymphoid tissue
In: Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology, p 129
Ed. FURTH,R. VAN
Blackwell Scientific Publications Oxford London Edinburgh

HORWITZ,D.A., ALLISON,A.C., WARD,P. und N.KIGHT (1977)
Identification of human mononuclear leucocyte populations by esterase staining
Clin. exp. Immunol. 30, 289-298

HOVMARK,A. (1977)
Acid alpha-naphthyl acetate esterase staining of t lymphocytes in human skin
Acta Dermat. 57, 497-502

KAPLAN,E.L., LAXDAL,T. und P.G.QUIE (1968)
Studies of polymorphnuclear leucocytes from patients with chronic granulomatous disease of childhood:bactericidal capacity of streptoco
Pedriatrics 41, 595-599

KELLY,D.F. (1970)
Canine cutaneous histiocytoma: a light and electron microscopic study
Path. vet. 7, 12-27

KELM,G. (1982)
Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Morphologie und die formale Pathogenese des kutanen Histiozytoms des Hundes
Diss., Fachber. Veterinärmed., Freie Universität Berlin

KLASEN,S.J. (1983)
Untersuchungen über die Kultivierung von Hühner-Blutmonozyten und über Eigenschaften der in vitro ausgereiften unvorbehandelten oder aktivierten Makrophagen.
Diss., Fachber. Veterinärmed., Freie Universität Berlin

KLEBANOFF,S.J. (1969)
Antimicrobial activity of catalase at acid pH
Proc. Soc. Exp. Med. 132, 571-574

KLEBANOFF,S.J. und C.B.HAMON (1975)
Antimicrobial systems of mononuclear phagocytes
In: Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology, p 507-529
Ed. FURTH,R. VAN
Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburg Melbourne

KNOWLES II,D.M. und J.P.HALPER (1980)
Human medullary and cortical thymocytes are distinguishable according to the presence or absence of cytochemically demonstrable acid alpha-naphthyl acetate esterase (ANAE) activity
J. Immunol. 125, 2823-2825

KNOWLES II,D.M., HALPER,J.P., MACHIN,G.A. und W.SHERMAN (1979)
Acid alpha-naphthyl acetate esterase activity in human neoplastic lymphoid cells
Am. J. Pathol. 96, 257-278

KNOWLES II,D.M., HOFFMAN,T., FERRARINI,M. und H.G.KUNKEI (1978)
The demonstration of acid alpha-naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: usefullness as a T-cell marker
Cell Immunol. 35, 112-123

KOJIMA,M. (1977)
Macrophages, reticuloendothelial system and mononuclear phagocyte system
Rec. Adv. RES Res. 16

KULENKAMPFF,J., JANOSSY,G. und M.F.GREAVES (1977)
Acid esterase in human lymphoid cells and leucaemic blasts: a marker for T lymphocytes
Br. J. Haematol. 36, 231-240

LEDER,L.D. (1964)
Über die selektive fermentcytochemische Darstellung von neutrophilen myeloischen Zellen und Gewebsmastzellen im Paraffinschnitt
Klin. Wschr. 42, 553

LI,C.Y., LAM,K.W. und L.T.YAM (1973)
Esterase in human leucocytes
J. Histochem. Cytochem. 21,1

LOJDA,Z., GOSSRAU,R. und T.H.SCHIEBLER (1976)
Enzym-histochemische Methoden
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

LUFT,J.H. (1961)
Improvments in epoxy resin emdebbing methods
J. biophy. biochem Cytol. 9, 409

MAGNOL,J.P., DEVAUCHELLE,P. und S.ACHACHE (1982)
L'Histiocytome Canin
Revue bibliographique et Observations personnelles
Revue Méd. vét. 133, 391-401

MEURET,G. (1978)
Monozytopoese, Makrophagenumsatz bei entzündlichen und malignen Erkrankungen
In: Haematology and Blood Transfusion, Vol. 21, p 363-375
Ed. SCHMALZL,F., HUHN,D. und H.E.SCHAEFER
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

MEURET,G. (1981)
The kinetics of mononuclear phagocytes in man
In: Disorders of the monocyte macrophage system, p 11-30
Haematology and Blood Transfusion, Vol. 27
Ed. SCHMALZL,F., HUHN,D. und H.E.SCHAEFER
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

MEURET,G., SCHMITT,E., TSELENI,S. und M.WIDMER (1978)
Monocyte production in Hodgkin's disease and Non-Hodgkin's lymphoma
Blut 37, 193

MILLER,F. und V.HERZOG (1969)
Die Lokalisation von Peroxidase und Saurer Phosphatase in eosinophilen Leukozyten während der Reifung. Elektronenmikroskopisch-cytochemische Untersuchungen am Knochenmark von Ratte und Kaninchen
Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat. 97, 84

MIMS,C.A. (1963)
The peritoneal macrophages in mice
Brit. J. exp. Pathol. 45, 37-43

MOLONEY,W., MCPHERSON,K. und L.FLIEGELMAN (1960)
Esterase activity in leucocytes demonstrated by the use of naphthol-AS-D-chloroacetate substrate
J. Histochem. Cytochem 8, 200-207

MOULTON,J.E. (1961)
Tumours in domestic animals
University of California Press, Boston Los Angeles

MUELLER,J., BRUN DEL RE,G., BUERKI,H., KELLER,H.U., HESS,M.W. und H.COTTIER (1975)
Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes
Eur. J. Immunol. 5, 270-274

MÜLLER-HERMELINK,H.K. und E.KAISERLING (1980)
Epitheloidzellreaktion im lymphatischen Gewebe, S. 77-102
In: Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie
64. Tagung
Ed. DHOM,G.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart New York

MYSLIWSKA,J., WITKOWSKI,J. und A.MYSLIWSKA (1980)
The relationship between mitogen-induced rosette formation and the ability of expressing alpha-naphthyl acetate esterase activity by mouse thymocytes
Immunobiol. 157, 190-195

NACHLAS,M.M. und A.M.SELIGMAN (1949)
The histchemical demonstration of esterase
J. Nat. Cancer Inst. 9, 415-425

NARDIELLO,S., PIZZELLA,T., RUSSO,M. und B.GALANTI (1982)
Esterase staining of monocytes in suspensions of ficoll-paque isolated mononuclear cells
J. Immunol. Methods 52, 111-114

NICHOLS,B.A. und D.F. BAINTON (1975)
Ultrastructure and cytochemistry of mononuclear phagocytes
In: Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology
Ed. FURTH,R. VAN
Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh Melbourne

OGAWA,T., KOERTEN,H.K. und W.T.DAEMS (1978)
Peroxidatic activity in monocytes and tissue macrophages of mice
Cell Tiss. Res. 188, 361-373

ORENSTEIN,J.M. und E.SHELTON (1976)
Surface topography of leucocytes in situ: Cells of mouse peritoneal milky spots
Exp. molec. Pathol. 24, 415-423

OSBALDISTON,G.W., SULLIVAN,R.J. und A.FOX (1978)
Cytochemical demonstration of esterases in peripheral blood leucocytes
Am. J. Vet. Res. 39, 683-685

PANGALIS,G.A., WALDMAN,S.R. und H.RAPPAPORT (1978)
Cytochemical findings in human nonneoplastic blood and tonsillar B and T lymphocytes
Am. J. Clin. Path. 69, 314-318

PARWARESCH,M.R., MÜLLER-HERMELINK,H.K., DESAGA,J.F., ZAKARI,V. und LENNERT,K. (1971)
Die Herkunft der Gewebsmastzelle bei der Ratte, zugleich ein Beitrag zur quantitativen Cytologie der sterilen Peritonitis.
Virchows Arch. Abt. B Zellpathol. 8, 20-35

PAYNE,B.C., KIM,H., PANGALIS,G.A., ROTHMAN,A. und H.RAPPAPORT (1980)
A method for the ultrastructural demonstration of nonspecific esterase in human blood and lymphoid tissue
Histochem. J. 12, 71-86

PEARSE,A.G.E. (1958)
Extension of the limits of cellular pathology: The role of enzyme histochemistry
J. Clin. Path. 11, 520-534

PINKUS,G.S., HARGREAVES,H.K., MCLEOD,J.A., NADLER,L.M., ROSENTHAL,D.S. und J.W.SAID (1979)
alpha-naphthyl acetate esterase activity- a cytochemical marker for T lymphocytes
Am. J. Pathol. 97, 17-42

RADZUN,H.J., PARWARESCH,M.R., KULENKAMPFF,C.,STAUDINGER,M. und H.STEIN (1980)
Lysosomal acid esterase: Activity and isoenzymes in separated normal human blood cells
Blood 55, 891-897

RANKI,A., REITAMO,S., KONTTINEN,Y.T. und P.HÄYRY (1980)
Histochemical identification of human T lymphocytes from paraffin sections
J. Histochem. Cytochem. 28, 704-707

RHEE,H.J. VAN DER, WINTER,C.P.M. DE und W.T.DAEMS (1977)
Fine structure and peroxidatic activity of rat blood monocytes
Cell Tiss. Res. 185, 1

RHEE,H.J. VAN DER, BURGH-DE WINTER,C.P.M. VAN DER und W.T.DAEMS (1979)
The differentiation of monocytes into macrophages, epithelioid cells and multinucleated giant cells in subcutaneous granulomas
Cell Tiss. Res. 197, 379-396

ROBBINS,D., FAHIMI,H.D. und D.S.COTRAN (1971)
Fine structural cytochemical localization of peroxidase activity in rat peritoneal cells: mononuclear cells, eosinophils and mast cells.
J. Histochem. Cytochem. 19, 571-575

ROELS,F., WISSE,E., DE PREST,B. und J.MEULEN VAN DER (1975)
Cytochemical discrimination between catalases and peroxidases using diaminobenzidine
Histochem. 41, 281-312

ROMEIS,B. (1968)
Mikroskopische Technik, S. 367, § 1524, 16. Auflage
R. Oldenbourg Verlag, München und Wien

RUDOLPH,R. (1972)
Untersuchungen zur Ultrastruktur, zum licht- und elektronenmikroskopischen Substrat- und Enzymgehalt sowie zur Übertragbarkeit von Mastzelltumoren des Hundes.
Habilitationsschrift 1972
Gießen

RUDOLPH,R. und W.SCHNABL (1979)
Histochemische, enzymhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Blutleukozyten von klinisch gesunden und leukämischen Schafen.
Vet. -Med. Nachr. 2, 140-153

RUDOLPH,R. und W.SCHNABL (1981)
Feinstruktur von Blutleukozyten sowie elektronenoptischer Nachweis von Peroxidase und Saurer Phosphatase in Granulozyten des Schafes.
Zbl. Vet. Med. A 28, 282-295

SCHLÜNS,J. und R.GRÄF (1976)
Über die Peroxidase in der Schweinemilz
Histochem. 48, 219-232

SELIGMAN,A.M., UENO,H., WASSERKRUG,H.L. und J.S.HANKER (1966)
Esterase method for light and elektron microscopy via the formation of osmophilic diazothioethers
Ann. Histochem. 11, 115-129

SHANDS,J.W. und B.J.AXELROD (1977)
Mouse peritoneal macrophages: traited thymidine and cell kinetics
J. Reticuloendothel. Soc. 21, 64

SMITH,R.E. und W.H.FISHMAN (1969)
p-(acetoxymercuric) aniline diazotate, a reagent for visualising the naphthol AS-BI product of acid hydrolase action at the level of light and electron microscopy
J. Histochem. Cytochem. 17, 122

SORANZO,M.R., KOERTEN,H.K. und W.T.DAEMS (1978)
Peroxidatic activity and morphometric analysis of alveolar macrophages in the guinea pig
J. Reticuloendothel. Soc. 23, 343

STANNARD,A.A. und L.T.PULLEY (1978)
Canine cutaneous histiocytoma
In: Tumours in domestic animals, p 24-26
Ed. MOULTON,J.E.
University of California Press, Barkeley Los Angeles London

STERRY,W., STEIGLEDER,G.K. und H.PULLMANN (1980)
In situ identification and enumeration of T lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas by demonstration of granular activity of acid non-specific esterase
Br. J. Dermatol. 103, 67

TAYLOR,D.O., DORN,C.R. und O.H.LUIS (1969)
Morphologic and biologic characteristics of the canine cutaneous histiocytoma
Cancer Res. 29, 83-92

TERRITO,M.C. und M.J.CLINE (1975)
Mononuclear phagocyte proliferation, maturation and function
In: Clinics in haematology. Granulocyte and monocyte abnormalities p 685-703
Ed. LASCH,H.G., PRANKERD,T.A.J., THOMPSON,R.B., WALLER,H.D., WEED,R.I. und M.A.LICHTMAN (1975)
W.B.Saunders Comp., London Philadelphia Toronto

TOLKSDORF,G. und H.STEIN (1979)
Acid alpha-naphthyl acetate esterase in hairy cell leucaemia cells and other cells of the hematopoetic system
Blut 39, 165-176

VENABLE,J.H. und R.COGGESHALL (1965)
A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy
J. Cell Biol. 25, 407-408

VOLKMAN,A. (1976)
Disparity in origin of mononuclear phagocyte populations
J. Reticuloendothel. Soc. 19, 49

WACHSTEIN,M. und G.WOLF (1958)
The histochemical demonstration of esterase activity in human blood and bone marrow smears
J. Histochem. Cytochem. 6, 457

WEISS,E. (1974)
Tumours of the soft (mesenchymal) tissues
Bull. Wld. Hlth. Org. 50, 101-110

WISSE,E. (1974)
Observation on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells
J. Ultrastruc. Res. 46, 393-426

YAM,L.T.,LI,C.Y. und W.H.CROSBY (1971)
Cytochemical identification of monocytes and granulocytes
Am. J. Clin. Path. 55, 283-290

YANG,T.J.,JANTZEN,P.A. und L.F.WILLIAMS (1979
Acid alpha-naphthyl acetate esterase: presence activity in bovine and human T and B lymphocytes
Immunol. 38, 85-93

YOUNG,C.W. und E.S.BITTAR (1973)
Analysis of tissue esterase from patients with Hodgkin's disease and other types of advanced cancer by isoelectric focusing in acrylamide gel
Cancer Res. 33, 2692

ZICCA,A., LEPRINI,A., CADONI,A., FRANZI,A.T., FERRARINI,M. und C.E.GROSSI (1981)
Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acetate esterase in human T lymphocytes
Am. J. Pathol. 105, 40-46

9. Abbildungen

Abb. 1

Nachweis der ALPHA-Naphthylazetat-Esterase im kutanen Histiozytom des Hundes: Enzymaktivität in allen Histiozytomzellen sowie auch in allen Zellen der Epidermis.(Kryostatschnitt).
Vergrößerung etwa 340 x (DIN A4)
220 x (DIN A5)

Abb. 2

Nachweis der ALPHA-Naphthylazetat-Esterase im kutanen Histiozytom des Hundes: granuläre zytoplasmatische Esterase-Reaktion in allen Histiozytomzellen (Kryostatschnitt).
Vergrößerung etwa 560 x (DIN A4)
380 x (DIN A5)

Abb. 3

Nachweis der ALPHA-Naphthylazetat-Esterase im kutanen Histiozytom des Hundes: enzympositive Granula liegen diffus im Zytoplasma, z.T. auf der Kernregion der Histiozytomzellen (Kryostatschnitt).
Vergrößerung etwa 1350 x (DIN A4)
930 x (DIN A5)

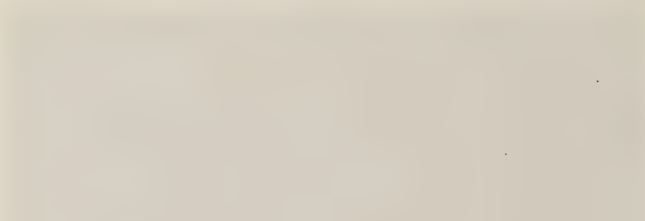


Abb. 4

Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase im kutanen Histiozytom des Hundes: granuläre Reaktion im Zytoplasma der Histiozytomzellen, starke Esterase-Aktivität im Bereich von Nekrosen (◀)(Kryostatschnitt).
Vergrößerung etwa 340 x (DIN A4)
220 x (DIN A5)

Abb. 5

Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase im kutanen Histiozytom des Hundes: enzympositive Granula in Histiozytomzellen, Gefäßendothelien (←) mit feiner granulärer Reaktion (Kryostatschnitt).
Vergrößerung etwa 340 x (DIN A4)
220 x (DIN A5)

Abb. 6

Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase im kutanen Histiozytom des Hundes in Form deutlicher roter Granula im Zytoplasma der Histiozytomzellen (Kryostatschnitt).
Vergrößerung etwa 1350 x (DIN A4)
930 x (DIN A5)

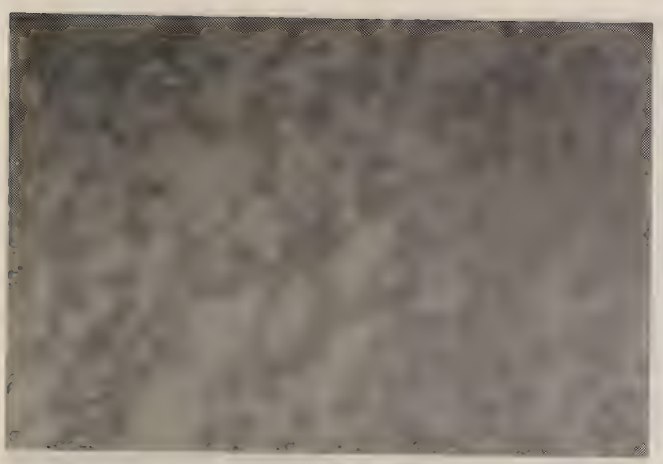


Abb. 7

Nachweis der Peroxidase im kutanen Histiozytom des Hundes: Histiozytomzellen sind Peroxidase-negativ, deutliche Enzymaktivität im Bereich von Nekrosen (◀) (Kryostatschnitt). Vergrößerung etwa 135 × (DIN A4)
92 × (DIN A5)

Abb. 8

Nachweis der Peroxidase im kutanen Histiozytom des Hundes: Histiozytomzellen ohne Reaktionsprodukt, Peroxidase-positive Granula im Zytoplasma von Granulozyten (←) (Kryostatschnitt). Vergrößerung etwa 1350 × (DIN A4)
930 × (DIN A5)

Abb. 9a,b

Nachweis der ANAE und der Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase im kutanen Histiozytom des Hundes (Doppelinkubation/Kryostatschnitt
9a: Einige Histiozytomzellen mit überwiegend starker granulärer ANAE-Reaktion (←—).
Vergrößerung etwa 340 × (DIN A4)
220 × (DIN A5)
9b: Bezirk mit ausschließlich Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase-positiven Granulozyten (←—).
Vergrößerung etwa 340 × (DIN A4)
220 × (DIN A5)

Abb. 10

Nachweis der ANAE und der Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase im kutanen Histiozytom des Hundes: Histiozytomzellen mit rot-schwarzen Mischgranula im Zytoplasma. Mastzelle (◀) mit starker Naphthol-AS-D-Chloroazetat-Esterase-Reaktion (Doppelinkubation/Kryostatschnitt).
Vergrößerung etwa 1350 × (DIN A4)
930 × (DIN A5)

Abb. 11

Kutanes Histiozytom des Hundes: Mastzellen (◀) mit violetten metachromatischen Granula (Unna-Färbung/Kryostatschnitt).
Vergrößerung etwa 1350 x (DIN A4)
930 x (DIN A5)

Abb. 12a,b

Nachweis der ANAE und der sauren Phosphatase im kutanen Histiozytom des Hundes (Doppelinkubation/Kryostatschnitt).
12 a: das Tumorgewebe erscheint blaß-rot, Granulozyten mit ausschließlicher Phosphatasereaktion (←—), einige Histiozytomzellen mit überwiegend schwarzer Granulation.
Vergrößerung etwa 135 x (DIN A4)
92 x (DIN A5)
12 b: Histiozytomzellen mit schwarzer ANAE-positiver Granulation im blaß-roten Zytoplasma (←—).
Vergrößerung etwa 1350 x (DIN A4)
930 x (DIN A5)

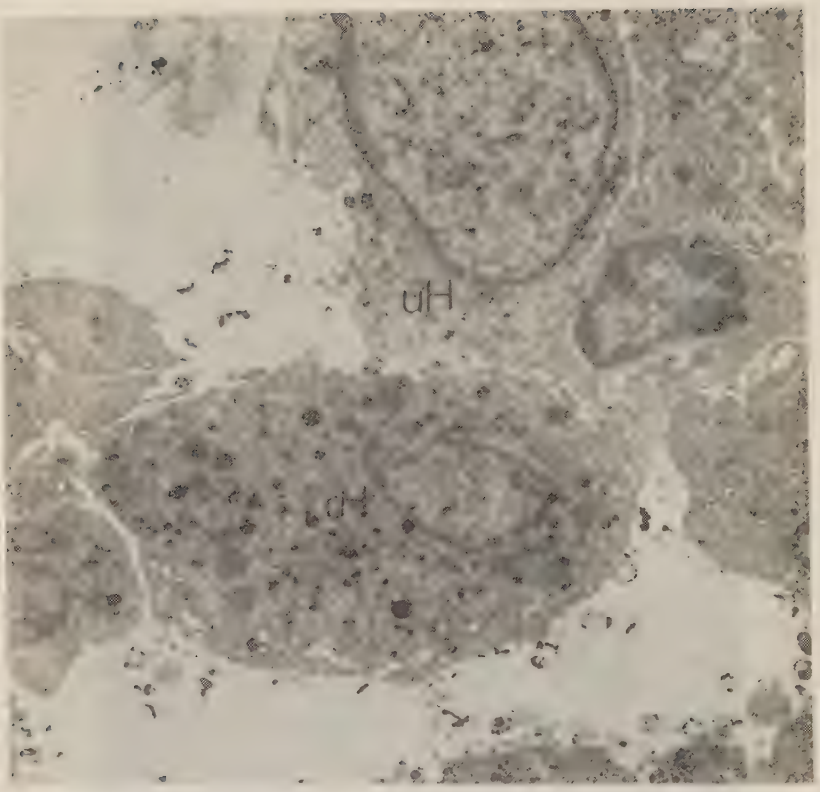


Abb. 13

Nachweis der 2-Naphthylthiolazetat-Esterase im kutanen Histiozytom des Hundes: reife Histiozytomzelle (rH) mit zahlreichen esterasepositiven Granula, darüber liegende undifferenzierte Histiozytomzelle (uH) mit nur vereinzelten enzympositiven Granula (Schnitt nicht kontrastiert).
Vergrößerung etwa 8620x (DIN A4)
5860x (DIN A5)

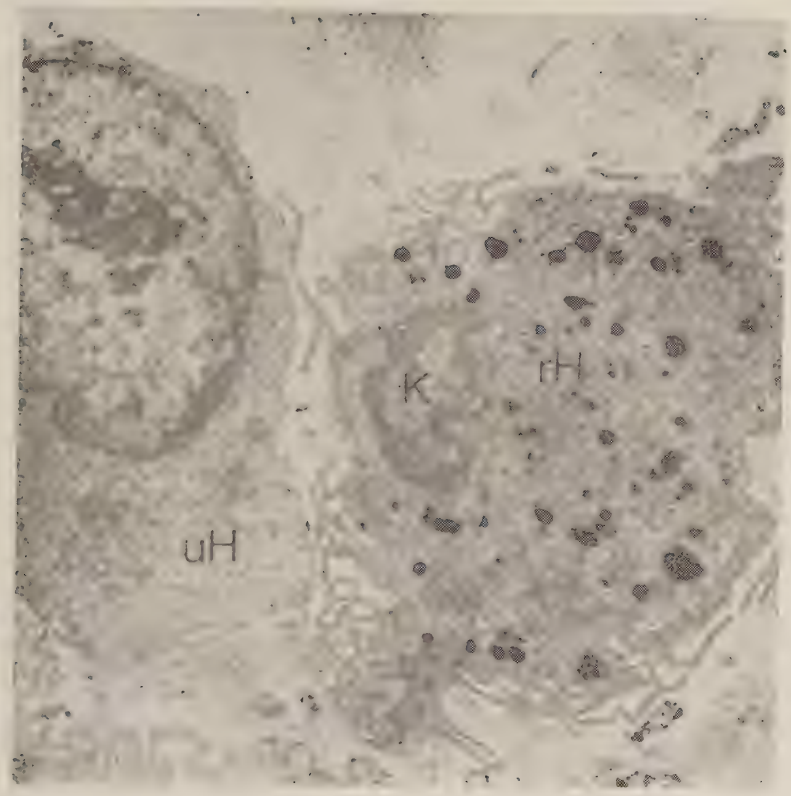


Abb. 14

Nachweis der 2-Naphthylthiolazetat-Esterase im kutanen Histiozytom des Hundes: enzympositive Granula in reifer Histiozytomzelle (rH) mit stark gegliederter Zytoplasmamembran und einem exzentrisch liegenden Kern (K), daneben eine undifferenzierte Histiozytomzelle (uH) ohne nachweisbare Esterasereaktion (Schnitt nicht kontrastiert).
Vergrößerung etwa 14 000x (DIN A4)
9 520x (DIN A5)

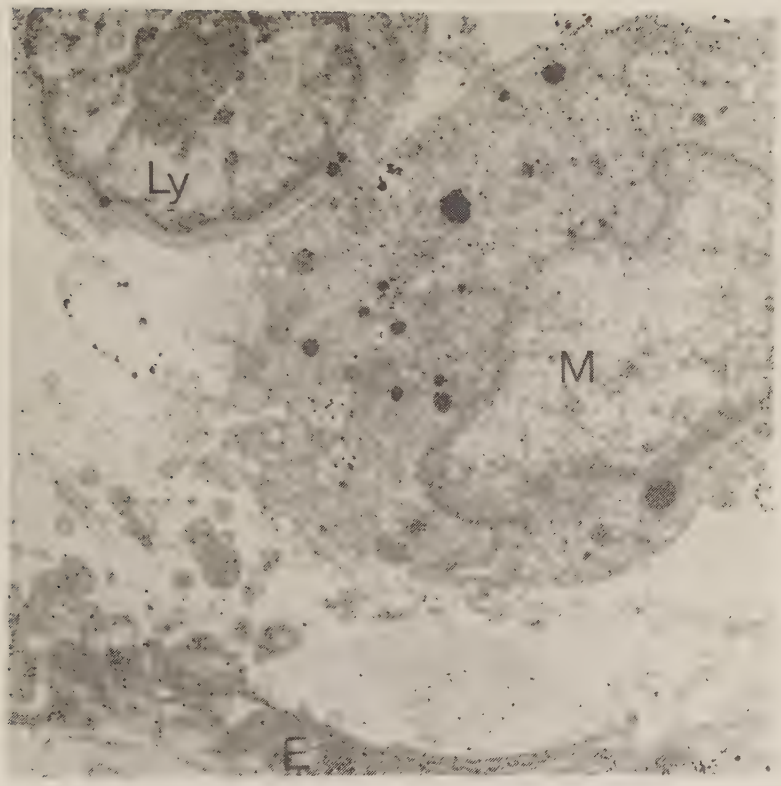


Abb. 15

Nachweis der 2-Naphthylthiolazetat-Esterase im kutanen Histiozytom des Hundes: Blutmonozyt (M) mit wenigen unterschiedlich elektronendichten enzympositiven Granula, daneben ein Lymphozyt (Ly), Gefäßendothel (E).
(Schnitt nicht kontrastiert)
Vergrößerung etwa 17 120x (DIN A4)
11 640x (DIN A5)

Abb. 16

Nachweis der 2-Naphthylthiolazetat-Esterase in einer Histiozytomzelle des Hundes: esterasepositive Granula, teils von einer Membran(◀) umgeben, teils ohne konturierte Membran (Schnitt nicht kontrastiert).
Vergrößerung etwa 150 000 x(DIN A4)
102 000 x(DIN A5)

Abb. 17

Nachweis der Peroxidase im kutanen Histiozytom des Hundes: Peroxidasereaktion im perinukleären Spaltraum (◀) eines Makrophagen (Schnitt nicht kontrastiert).
Vergrößerung etwa 71 300 x (DIN A4)
48 500 x (DIN A5)

Lebenslauf

Name	Weber, Thomas Christian
Geburtsdatum	11. Februar 1954
Geburtsort	Frankfurt/Main
Schulausbildung	1960-1965 Grundschule in Ottobrunn/München 1965-1969 Albert-Einstein-Gymnasium in München 1969-1975 Gymnasium in Neustadt aRbg. Mai 1975 Abitur
Wehrdienst	Okt. 1975 - Dez. 1976 in Bad Reichenhall
Studium	1977-1982 an der FU-Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin Febr. 1982 Staatsexamen
Approbation	Mai 1982

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Rudolph für die Überlassung des vorliegenden Themas sowie für die fachliche Kritik und hilfreichen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof Dr. Schlüns für die stets gewährte fachliche und technische Beratung.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Fr. Anita Maeder und dem Labor von Fr. Ilgmann bedanken für deren tatkräftige Mitwirkung.

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen